

QUANTIFICAÇÃO DOS TANINOS DOS VINHOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER DOS ESPECTROS NO INFRAVERMELHO MÉDIO (FTIR)

Ana Paula Recco Nascimento

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Viticultura e Enologia

Orientadora: Licenciada Olga Maria Carrasqueira Laureano

Júri:

Presidente: Doutor Jorge Manuel Rodrigues Ricardo da Silva, Professor Associado do
Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Licenciada Olga Maria Carrasqueira Laureano, Investigadora Coordenadora do
Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor José Carlos de Carvalho Rodrigues, Investigador Auxiliar do Instituto de
Investigação Científica Tropical.

Lisboa, 2011

Agradecimentos

Aos meus pais, Ronaldo e Regina, pelas orações, carinho, dedicação e força nos meus momentos de fraqueza.

Ao Marco pelo carinho, paciência, compreensão. Por estar sempre presente tanto nos bons momentos como nas situações mais difíceis, dando-me sempre o apoio e a força necessária para prosseguir.

À professora Doutora Olga Laureano, pela colaboração, orientação e paciência mostrada ao longo da realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Jorge Ricardo da Silva pela disponibilidade, colaboração, ensinamentos e sugestões acadêmicas.

Aos funcionários do Laboratório Ferreira Lapa por todo o apoio e carinho. Em especial a D^a Graziela pela sua preciosa ajuda, apoio, amizade e atenção ao longo da realização deste estudo.

Aos meus amigos, pelos bons momentos que passámos juntos ao longo do mestrado e pelas conversas e incentivo durante os momentos de desânimo.

Resumo

Vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a quantificação dos taninos condensados, no entanto o tempo requerido e a complexidade destes métodos dificultam a implementação em análises de rotina. Neste trabalho o objetivo foi avaliar a aplicação da espectroscopia no infravermelho médio com transformada de Fourier, para a quantificação dos taninos condensados totais, bem como a determinação das suas frações poliméricas (FIII), oligoméricas (FII) e dos 3-flavanóis monoméricos (FI) em 55 vinhos tintos. Foram desenvolvidos modelos de calibração utilizando duas metodologias como referência: método de fracionamento por fase reversa e quantificação por reação com vanilina e o método de precipitação com metil celulose. Os resultados demonstram que os coeficientes de determinação obtidos pela validação externa dos modelos foram inferiores a 0,80, excepto para o modelo de predição dos taninos condensados poliméricos com concentrações superiores a 400 mg/L, no entanto este modelo não foi considerado robusto, devido ao elevado erro padrão de calibração obtido na validação cruzada (SEC= 512,4 mg/L) e o baixo número de amostras na validação externa (n=5), o que leva a concluir que neste estudo os modelos não são suficientemente robustos para a predição das concentrações de taninos condensados totais, bem como das frações FI, FII e FIII.

Palavras-chave: FTIR; taninos condensados; 3-flavanóis; vinhos; proantocianidinas, metil celulose.

Abstract

Several analytical methods have been developed for the quantification of condensed tannins, however the time required and complexity of these methods difficult to implement in routine analysis. In this work the objective was to evaluate the application of Fourier transform mid-infrared spectroscopy for the quantification of total condensed tannins, as well as the determination of their polymeric fractions (FIII), oligomeric (FII) and monomeric flavan-3-ols (FI) in 55 red wines. Calibration models were developed using two methodologies as reference: fractionation by reverse phase method and quantification by reaction with vanillin and the method of precipitation with methyl cellulose. The results show that the coefficients of determination obtained by the external validation of the models were less than 0.80, except for the prediction model of polymeric tannins at concentrations greater than 400 mg / L, but this model was not considered robust, because the high standard error of calibration obtained in cross validation (SEC = 512,4 mg / L) and low number of samples in the external validation (n = 5), which leads to the conclusion that in this study the models are not robust enough to estimation of concentrations of total condensed tannins, and fractions FI, FII and FIII.

Keywords: FTIR, condensed tannins, flavan-3-ols, wine, proanthocyanidins, methyl cellulose.

Extended summary

The concentration and composition of the condensed tannins are extremely important in the final quality of red wines; mainly by contribute to the stability of the color, astringency, bitterness and aging of wine. Several analytical methods have been developed for measuring and determining the composition of condensed tannins, however the time required and complexity of these methods is difficult to implement in routine analysis. Using the technique of mid-infrared spectroscopy by Fourier transform (FTIR) in the wine sector has demonstrated a high analytical potential, allowing simultaneous measurement of a large number of parameters of musts and wines in a short period of time. In this work the objective was to evaluate the application of FTIR spectroscopy for the quantification of total of condensed tannins, as well as the determination of their polymeric fractions (FIII), oligomeric (FII) and monomeric flavan-3-ols (FI) in wine red ($n = 55$), using four spectral regions: 1230 to 1320, from 1450 to 1510, from 1580 to 1615 and from 1660 to 2000 cm^{-1} . To this end, calibration models were developed by partial least squares (PLS) using two reference methods: method of fractionation by reverse phase, followed by quantification of the fractions by colorimetric reaction with vanillin and the method of precipitation with methyl cellulose (MCP method). The results of five linear calibration models developed in this study demonstrated a high correlation between the values predicted by the model and the values obtained by two reference methods used, with coefficients of determination for cross-validation high, close to one. However, the determination coefficients obtained by the external validation of the models were less than 0.80, except for the prediction model of polymeric tannins at concentrations greater than 400 mg / L, however this model was not considered sufficiently robust because the high standard error of calibration obtained in cross validation ($\text{SEC} = 512.4 \text{ mg / L}$) and the low number of samples used for external validation ($n = 5$). The models developed had a low predictive capacity for estimating the concentrations of total condensed tannins, monomeric flavan-3-ols (FI), oligomeric tannins (FII) and polymeric condensed tannins in concentrations below and above 400 mg / L (FIII), which leads to the conclusion that in this study are not robust enough.

Keywords: FTIR, condensed tannins, flavan-3-ols, wine, proanthocyanidins, methyl cellulose.

Índice

1. Introdução	1
2. Revisão da literatura	3
2.1 Taninos condensados.....	3
2.1.1 Estrutura e distribuição na uva	3
2.1.2 Extração dos taninos da uva para o vinho.....	4
2.1.3 Reações dos taninos da uva nos mostos e vinhos	5
2.1.4 Aspectos biológicos	6
2.2. Métodos de quantificação dos taninos da uva	7
2.2.1 Métodos espectrofotométricos	7
2.2.2 Métodos cromatográficos	11
2.2.3 Fracionamento e isolamento	12
2.3 Espectrometria de infravermelho – Considerações gerais	14
2.3.1 Infravermelho por transformada de Fourier	15
2.3.2 Aplicações da espectrometria FTIR em viticultura e enologia.....	16
2.4 Quimiometria	20
2.4.1 Calibração multivariada.....	21
2.4.1.1 Análise de Componentes Principais	21
2.4.1.2 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais	23
2.4.2 Pré-tratamento dos dados.....	24
3. Materiais e métodos	27
3.1 Caracterização das amostras	27
3.2 Métodos de referência	27
3.2.1 Fracionamento das proantocianidinas por extração em fase sólida.....	27
3.2.1.2 Quantificação das frações FI, FII e FIII por reação com vanilina	29
3.2.2 Quantificação dos taninos condensados totais por precipitação com metil celulose.....	29
3.3 Aquisição espectral dos vinhos.....	30
3.4 Desenvolvimento dos modelos de calibração	30

4. Resultados e discussão	31
4.1 Espectros	34
4.2 Modelo para predição dos taninos condensados totais.....	34
4.3 Modelo para predição dos 3-flavanóis monoméricos (FI).....	36
4.4 Modelo para predição dos taninos condensados oligoméricos (FII).....	38
4.5 Modelo para predição dos taninos condensados poliméricos (FIII).....	39
5. Conclusão	45
6. Bibliografia	46
7. Anexos.....	57

Índice de Figuras

Figura 1 - Estrutura de dímeros de procianidinas contendo uma ligação interflavânica C4-C8. Adaptado de Passos et al. (2010).	4
(Figura 2 – Reação da vanilina com 3-flavanól monomérico produzindo um aducto vermelho com absorvância máxima a 500 nm (http://chemistry.muohio.edu/hagerman).....	9
Figura 3 - Modos de vibração molecular. Os sinais X e • indicam movimentos para dentro e fora do plano do desenho, respectivamente (http://www.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm). ..	15
Figura 4 - Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson e do espectro resultante da aplicação da FT (Helfer et al., 2006).....	16
Figura 5 - Esquemática descrição da decomposição da matriz X com PCA utilizando dois PC. (Adaptado de Wiberg, 2004).....	22
Figura 6 - Interpretação gráfica de um modelo de PCA consistindo de um PC: a) Dados do conjunto composto por doze objetos e três variáveis, b) uma interpretação geométrica do PC calculado a partir do conjunto de dados (Adaptado de Wiberg, 2004).	23
Figura 7 - Fracionamento dos vinhos tintos pelo método de Sun et al., (1998).	28
Figura 8 - Espectros dos vinhos tintos no FTIR (1000 – 3000 cm ⁻¹).....	34
Figura 9 - Resultados e gráfico do modelo de quantificação dos taninos condensados totais (mg/L) previstas pelo modelo (INST) versus valores de referência (REF), para 41 amostras em duplicata.	35
Figura 10 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de calibração linear e os valores de taninos condensados (mg/L) obtidos pelo método de referência, para o conjunto de 11 amostras em duplicata.	36
Figura 11 - Resultados e gráfico do modelo de quantificação dos 3-flavanóis monoméricos (mg/L) previstas pelo modelo (INST) versus valores de referência (REF), para 41 amostras em duplicata.	37
Figura 12 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de calibração linear e os valores de 3-flavanóis (mg/L) obtidos pelo método de referência, para o conjunto de 11 amostras em duplicata.....	37

Figura 13 - Resultados e gráfico do modelo de quantificação dos taninos oligoméricos (mg/L) previstas pelo modelo (INST) versus valores de referência (REF), para 41 amostras em duplicata.....	38
Figura 14 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de calibração linear e os valores de taninos oligoméricos (mg/L) obtidos pelo método de referência, para o conjunto de 11 amostras em duplicata.	39
Figura 15 - Resultados e gráfico do modelo de quantificação dos taninos poliméricos com concentrações inferiores a 400 mg/L (mg/L) previstas pelo modelo (INST) versus valores de referência (REF), para 41 amostras em duplicata.	40
Figura 16 - Resultados e gráfico do modelo de quantificação dos taninos poliméricos com concentrações superiores a 400 mg/L (mg/L) previstas pelo modelo (INST) versus valores de referência (REF), para 41 amostras em duplicata.	41
Figura 17 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de calibração linear e os valores de taninos poliméricos com concentrações inferiores a 400 mg/L obtidos pelo método de referência, para o conjunto de 6 amostras em duplicata.....	42
Figura 18 - Relação entre os valores preditos pelo modelo de calibração linear e os valores de taninos poliméricos com concentrações superiores a 400 mg/L obtidos pelo método de referência, para o conjunto de 6 amostras em duplicata.....	43

Índice de Quadros

Quadro 1 - Aplicações da espectrometria FTIR na região do MIR em viticultura e enologia. Elaborado pelo autor.	20
---	----

Lista de abreviaturas

ATR - Refletância total atenuada

BSA - Albumina de soro bovino

DAD - Detetores de arranjo de diodos

DMACA - p-dimetilaminocinmaldeído

FI - Fração monomérica/3-flavanóis monoméricos

FII - Fração oligomérica/taninos condensados oligoméricos

FIII - Fração polimérica/taninos condensados poliméricos

FT - Transformada de Fourier

FTIR - Infravermelho com Transformada de Fourier

GMP - Grau médio de polimerização

HPLC - Cromatografia líquida de alta eficiência

MCP - Precipitação com metil celulose

MIR - Infravermelho médio

MSC - Correção do Efeito de Espalhamento Multiplicativo

NIR - Infravermelho próximo

PC - Componentes principais

PCA - Análise de componentes principais

PLS - Mínimos quadrados parciais

PRESS - Soma dos Quadrados dos resíduos de predição

r - Coeficiente de correlação

R² - Coeficiente de determinação

RPD - Desvio residual de previsão

SECV - Erro padrão da validação cruzada

SEP - Erro padrão de validação externa

1. Introdução

Os taninos condensados estão presentes principalmente nas partes sólidas do cacho da uva – película, grainhas e engaços - que são extraídos durante a vinificação, resultando no grupo mais abundante de compostos fenólicos normalmente encontrados nos vinhos tintos. Estes desempenham um papel crítico na qualidade final dos vinhos tintos, principalmente por contribuírem para a estabilidade da cor, da adstringência, do amargor e do envelhecimento dos vinhos, além de trazer benefícios importantes para a saúde, devido a suas propriedades antioxidantes entre outras.

Várias metodologias de quantificação dos taninos condensados em vinhos têm sido desenvolvidas, no entanto, o tempo requerido por estes métodos representa atualmente um grande obstáculo para a sua implementação como método de rotina no controle de qualidade do setor vitivinícola (Fernández *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2008).

Neste setor verifica-se atualmente uma procura por métodos analíticos que permitem a medição simultânea de um grande número de parâmetros dos mostos e vinhos. Medições estas que necessitam de ser precisas, automáticas, rápidas e de baixo custo. Dentre os métodos analíticos, a técnica de espectrometria de absorção no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) tanto no infravermelho médio (MIR) como no infravermelho próximo (NIR), têm demonstrado um elevado potencial analítico no setor vitivinícola.

A espectroscopia FTIR possibilita o controle imediato das matérias-primas, do processo de produção e sobre as características do produto acabado, permitindo assim que vários parâmetros do vinho possam ser analisados simultaneamente em um curto período de tempo (Moreira, Marcos e Barros, 2002; Patz *et al.*, 2004; Boulet, Williams e Doco, 2007).

No entanto, a aplicação desta técnica para a quantificação direta dos taninos condensados tem apresentado grandes obstáculos, devido principalmente às interferências causadas pelas bandas de absorção dos demais componentes do vinho.

O efeitos destas interferências têm sido contornadas pela purificação prévia das amostras, ou por dispositivos instrumentais, como reflectância total atenuada (ATR), no entanto, estas técnicas não são viáveis para a realização de análises rápidas na determinação de taninos condensados (Passos *et al.*, 2010).

Neste contexto, o objetivo geral do estudo em questão é verificar a aplicabilidade da espectroscopia FTIR no MIR, para a quantificação dos taninos condensados totais, bem como a determinação das suas frações poliméricas (FIII), oligoméricas (FII) e dos 3-flavanóis monoméricos (FI) presentes nos vinhos tintos por análise direta, sem nenhum tratamento prévio.

Modelos de calibração para quantificação das frações e dos teores de taninos condensados totais foram desenvolvidos e validados, aplicando dois métodos de referência.

A metodologia desenvolvida por Sun *et al.* (1998a; 1998b) para o fracionamento e quantificação das frações e a metodologia desenvolvida por Sarneckis *et al.* (2006), conhecida como método MCP, para a quantificação dos taninos condensados totais.

Os objetivos específicos foram verificar se o modelo de calibração linear desenvolvido para cada fração (FI, FII e FIII) e o obtido para a quantificação dos taninos condensados totais são suficientemente robustos, ou seja, possuem capacidade preditiva para as suas respectivas quantificações por espectroscopia FTIR.

O presente estudo se justifica em decorrência da quantificação das três frações de taninos condensados que permite obter um maior conhecimento sobre a sua composição e a sua distribuição nos vinhos tintos, conhecimento este, de extrema importância, visto que, muitas de suas propriedades mencionadas no início deste capítulo dependem do seu grau de polimerização (Rigaud *et al.*, 1993). Entre estas propriedades a destacar:

- O aumento da percepção da adstringência está associado ao aumento da polimerização dos taninos condensados .

- Os efeitos biológicos positivos na prevenção de doenças, causados pela ingestão de taninos condensados normalmente aumentam com o aumento do seu grau de polimerização (Serrano *et al.*, 2009).

- A diminuição da adstringência durante o envelhecimento do vinho é geralmente atribuída ao aumento da polimerização das proantocianidinas ou pela combinação destas com antocianinas, o que contribui para a coloração vermelho-acastanhado dos vinhos envelhecidos (Vidal *et al.*, 2002; Ricardo da Silva e Laureano, 2004)

O trabalho em questão foi estruturado em duas partes principais. Na primeira encontra-se a revisão da literatura onde aborda os aspectos de natureza teórica em que o estudo se encontra inserido, e refere os resultados mais significativos decorrentes da revisão da literatura realizada. A segunda parte do trabalho encontra-se dividida em três capítulos. Compreende a metodologia utilizada, a apresentação e discussão dos resultados e por fim o capítulo dedicado a conclusão e indicações para estudos futuros.

2. Revisão da literatura

Na primeira parte, pretende-se, descrever a estrutura e distribuição dos taninos condensados, bem como a sua extração para os mostos e as possíveis reações que ocorrem nestes e nos vinhos, além dos seus aspectos biológicos. Em seguida aborda-se os métodos de quantificação mais relevantes para a sua quantificação, bem como os métodos de fracionamento para a determinação de sua composição.

Na segunda parte são abordados os fundamentos da espectrometria no infravermelho por transformada de Fourier e as suas aplicações em viticultura e enologia. Finalmente na terceira parte é feita uma referência sobre os tratamentos estatísticos utilizados no presente estudo.

2.1 Taninos condensados

2.1.1 Estrutura e distribuição na uva

As proantocianidinas também conhecidas como taninos condensados são resultantes do metabolismo secundário da videira, onde seus teores crescem rapidamente da formação do bago até próximo da fase do pintor. Nesta altura começam a surgir as antocianinas e as proantocianidinas decrescem de uma forma acentuada e tendem a estabilizar quando se aproximam da fase de maturação tecnológica (Ó-Marques, 2005)

Os taninos condensados são constituídos por oligômeros e polímeros de unidades monoméricas de 3-flavanóis, unidos principalmente por ligações interflavânicas C₄-C₈ e em menores quantidades por ligações C₄-C₆ (Figura 1).

O termo proantocianidinas, deriva do fato destas libertarem antocianidinas por ruptura da ligação C-O, quando aquecidas em meio fortemente ácido e alcoólico, mediante à ruptura das suas ligações interflavânicas. Consoante se liberte cianidina ou delphinidina, estas moléculas recebem o nome de procianidinas ou prodelfinidinas. As primeiras são polímeros de catequina e epicatequina e as segundas são constituídas por galocatequina e epigalocatequina, as proantocianidinas das uvas e dos vinhos são sobretudo procianidinas. De acordo com o aumento do grau de polimerização, estas são definidas como dímeros, trímeros, oligómeros e polímeros.

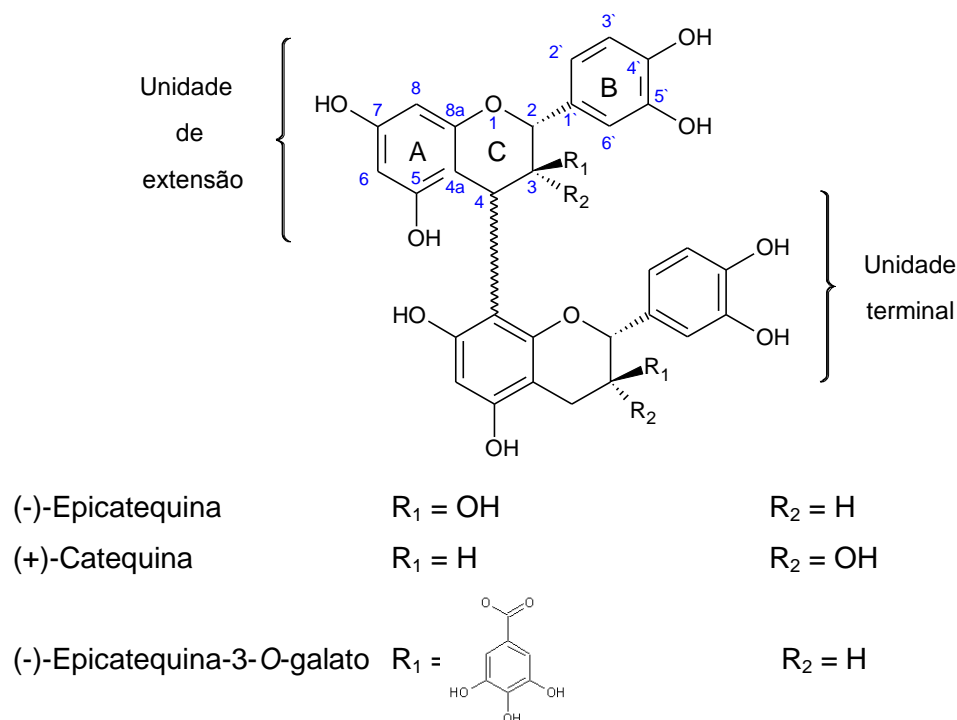


Figura 1 - Estrutura de dímeros de procianidinas contendo uma ligação interflavânica C4-C8.
Adaptado de Passos *et al.* (2010).

Os principais monómeros observados em *Vitis Vinífera* são (+)-catequina, (-)-epicatequina, galato de (-)-epicatequina e galocatequina (Su e Singleton, 1969; Lea *et al.* 1979). Estão localizados principalmente nas grainhas e película, embora tenham sido detetados monómeros e dímeros na polpa, especialmente na variedade tintureira Alicante Bouschet (Bourzeix, Weyland e Heredia, 1986).

Os taninos da uva estão presentes principalmente na forma polimerizada, menores quantidades na forma oligomérica e em teores muito inferiores em monómeros (Souquet *et al.*, 1996; Ó-Marques, 2005).

2.1.2 Extração dos taninos da uva para o vinho

Uma vez que estão localizadas quase que exclusivamente nas partes sólidas do cacho (películas, grainhas e engaços), a sua transferência para o mosto e vinho é determinada principalmente pelo grau de maceração durante o processo de vinificação. Polímeros com maior peso molecular difundem mais lentamente do que aqueles de menor peso molecular (Cheynier, 2006).

Vinhos brancos produzidos sem maceração contêm quantidades muito baixas de proantocianidinas. No entanto, a produção de vinho a partir de uvas brancas com maceração pelicular resulta em um aumento destas nos mostos e vinhos (Somers e Pocock, 1991).

Os taninos condensados presentes nas películas da uva diferem dos presentes na grainha pela presença de prodelphinidinas (Fuleki e Ricardo da Silva, 1997). Apesar de as grainhas possuírem uma maior concentração de taninos condensados, os presentes na película, devem ser mais facilmente extraídos durante a vinificação, dada a sua localização e a uma maior solubilidade / polaridade das prodelphinidinas quando comparada as procianidinas aciladas (Souquet *et al.*, 1996).

2.1.3 Reações dos taninos da uva nos mostos e vinhos

As mudanças na composição dos taninos da uva nos mostos e vinhos envolvem processos enzimáticos e químicos. O primeiro é restrito aos primeiros estágios da vinificação, enquanto o segundo torna-se rapidamente prevalente como as enzimas são inativadas, e continua ao longo do envelhecimento. Sejam eles bioquímicos ou químicos, estes processos se baseiam principalmente na reatividade do grupo hidroxilo do fenol e que pode ser modulada pela presença de substituintes (Cheynier, 2006).

Os núcleos dos 3-flavanóis podem sofrer substituições, nomeadamente hidroxilações nas posições 5 e 7 do anel A, em 3', 4' e/ou 5' do anel B e na posição 3 do heterociclo (Figura 1). As unidades monoméricas das proantocianidinas podem ainda estar aciladas, sendo que a totalidade das proantocianidinas aciladas encontradas na uva são constituídas por ésteres de ácido gálico, na posição 3 do anel C.

Esta reatividade é devida, por um lado, à acidez dos seus grupos hidroxilas fenólicos e, por outro lado, pela ressonância entre o par de electrões livres no oxigénio fenólico e o anel de benzeno, o que aumenta a deslocalização dos electrões e confere a posição de substituição adjacente ao grupo hidroxilo uma carga parcialmente negativa e, portanto, um carácter nucleofílico.

Deste modo, flavanóis reagem tanto como nucleófilos, através de seu anel A, onde possuem duas posições nucleofílicas, em C₈ e C₆, bem como eletrófilos, através dos carbocátions formados após clivagem por catálise ácida das ligações interflavânicas, sendo que esta última reação ocorre espontaneamente em valores de pH do vinho e é restrita a oligómeros e polímeros (Vidal *et al.*, 2002)

Os fenóis também são facilmente oxidados a radicais quinona por meio de transferência de elétrons. Estes radicais podem reagir com outro radical para formar um aducto através do acoplamento a outro radical ou, no caso de o-difenóis, sofrem uma segunda etapa de oxidação produzindo o-quinonas, que são eletrófilos, bem como oxidantes (Hapiot *et al.*, 1996).

Reações de oxidação são muito lentas em vinho, devido à baixa proporção de iões fenolato nos valores de pH do vinho, mas ocorrem de forma extremamente rápida, quando enzimas oxidativas estão envolvidas (Cheynier, 2006).

Mudanças nas propriedades organoléptica, nomeadamente cor e sabor, que ocorrem durante o envelhecimento dos vinhos têm sido atribuídas à conversão das antocianinas da uva a pigmentos poliméricos por meio de reações de adição com flavanóis (Somers, 1971). Três mecanismos têm sido propostos para este fenómeno:

O primeiro envolve a adição nucleofílica de flavanols (em C₈ ou C₆) na posição C₄ do ião flavilium das antocianinas produzindo aductos de tanino-antocianina (A-T).

O segundo mecanismo é baseado na adição nucleofílica sobre os iões carbônio formado pela clivagem de procianidinas.

O terceiro mecanismo envolve a adição nucleofílica do flavanol em acetaldeídos protonados, seguido de protonação e desidratação do aducto resultante e posterior adição nucleofílica de um segundo flavonóide para o carbocátion então formado, os produtos resultantes são aductos de antocianina-flavanol. Reações de antocianinas e flavonóis ocorrem muito mais rápido na presença de acetaldeído que está presente no vinho como um resultado do metabolismo das leveduras e da oxidação do etanol, na presença de compostos fenólicos (Timberlake e Bridle, 1976).

Estes mecanismos levam a uma grande diversidade de novos compostos fenólicos e como consequência as proantocianidinas estão presentes tanto na forma livre como na forma combinada. O número de isómeros de proantocianidinas também aumenta de forma acentuada com o aumento do seu grau de polimerização.

2.1.4 Aspectos biológicos

Atualmente, a maioria do interesse na ingestão de taninos da uva deriva das possíveis implicações para a prevenção de doenças. Os efeitos biológicos da ingestão de taninos condensados dependem geralmente do seu grau de polimerização e solubilidade (Serrano *et al.*, 2009).

Quimicamente, os taninos podem exercer as suas propriedades biológicas de três maneiras diferentes: (i) por complexação com íons metálicos, (ii) através de captação de antioxidantes e radicais (iii) através da sua capacidade para complexar com outras moléculas, incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos (Haslam, 1996)

Propriedades antioxidantes e de captação de radicais: Uma das principais consequências do stress oxidativo é a peroxidação lipídica, taninos são conhecidos por inibi-las e tem sido demonstrado a sua capacidade para captar os radicais livres (Gyamfi e Aniya, 2002). A capacidade de captação de radicais, depende em grande parte da sua estrutura, particularmente do seu grau de polimerização, a partir do qual um aumento do poder de captação de radicais é observado com um aumento no grau de polimerização (Jerez *et al.*, 2007).

Propriedades antimicrobianas e antivirais: Em termos gerais, os taninos parecem afetar o crescimento bacteriano por vários mecanismos, como a inibição de enzimas microbianas extracelulares, a privação dos substratos necessários para o crescimento microbiano ou a ação direta sobre o metabolismo microbiano através da inibição da fosforilação oxidativa (Scalbert, 1991). Atividade antiviral também tem sido demonstrada em análises de vírus da Herpes, onde as atividades antivirais dos taninos condensados aumentaram com o grau de condensação (Fukuchi *et al.*, 1989).

Doenças cardiovasculares: estudos têm associado o consumo de proantocianidinas com reduções nos fatores de risco para doenças cardiovasculares. Eles também mostraram reduções significativas nos níveis de colesterol plasmático e na extensão da aterosclerose após a ingestão de proantocianidinas (Serrano *et al.*, 2009).

Diabetes mellitus: as proantocianidinas podem agir de duas formas: pode diminuir os níveis de glicose, retardando a absorção de glicose intestinal e podem retardar o aparecimento da diabetes insulino-dependente, regulando o ambiente antioxidante das células b-pancreáticas (Serrano *et al.*, 2009).

2.2. Métodos de quantificação dos taninos da uva

Em síntese, os métodos para a quantificação dos taninos condensados das uvas e dos vinhos dividem-se principalmente em métodos espectrofotométricos e métodos cromatográficos. Vários dos métodos colorimétricos pressupõem a precipitação prévia dos taninos.

2.2.1 Métodos espectrofotométricos

Os métodos colorimétricos são geralmente demorados, empregam produtos químicos que exigem condições especiais de manipulação e, sobretudo, falta de especificidade, portanto eles só são apropriados para análise de amostras purificadas. A aplicação destes métodos em extractos de uvas ou vinhos é prejudicado pela presença de outros compostos fenólicos e outros interferentes (Herderich e Smith, 2005).

Embora os métodos de Folin-Ciocalteu e Azul da Prússia sejam amplamente utilizados para quantificação dos polifenóis totais ou taninos em mostos e vinhos, estes não são específicos para as proantocianidinas, porque os demais compostos fenólicos e outros componentes do vinho podem também reagir (Sun *et al.*, 1998a).

Os métodos acima mencionados são baseados na oxidação dos polifenóis por reações de oxidação-redução. As interferências verificadas pelo método de Folin-Ciocalteu são superiores ao do método do Azul da Prússia, já que os compostos não fenólicos, ascorbatos e sulfitos são substâncias potencialmente interferentes na determinação pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos, 1999).

A metodologia desenvolvida por Stevanato *et al.* (2004) para a determinação do teor de polifenóis totais em vinhos baseia-se novamente em reações de oxidação dos fenóis catalisadas pela enzima peroxidase. Os radicais fenoxila formados reagem com substratos aromáticos sendo então quantificados em A_{500} pelos teores de quinona-imina coloridas formadas. Quando comparado com o método de Folin-Ciocalteu, verificou-se ser mais rápido e específico.

No entanto, as reações redox envolvidas no método de Stevanato *et al.* (2004), nem sempre são reações quantitativas, devido às reações serem reversíveis. Uma outra desvantagem é que a reação ocorre com maior ou menor intensidade, consoante o grau de substituições hidroxilas e a sua respectiva posição nos anéis dos flavan-3-ol. Ressaltando também que os grupos hidroxilo na posição meta do anel A não estão envolvidas nestas reações.

O método de despolimerização com Butanol/HCl, ainda é largamente utilizado como um teste de diagnóstico, já que não detecta os taninos hidrolisáveis, sendo assim seletivo para os taninos condensados. Este método baseia-se na clivagem oxidativa catalisada por ácido das ligações interflavânicas das proantocianidinas, em meio hidroalcoólico. Deste modo, cedem unidades individuais, que são oxidadas em antocianidinas cromóforas que assumem uma coloração vermelha com máximos de absorção em torno de 550 nm (Porter, Hrstich e Chan, 1986)

A metodologia descrita acima é muito específica para a estimativa das proantocianidinas, mas possui muitas falhas. Em primeiro lugar, a transformação da proantocianidinas em antocianidinas não é completa, porque o rendimento de antocianidinas coloridas dependem tanto da estrutura como do grau de polimerização das mesmas. Em segundo lugar, as reações colaterais são comuns durante a reação, o que leva à formação de polímeros vermelho-acastanhado absorvendo a cerca de 450 nm, resultando em um erro de estimativa. E por último, é influenciado por variações no teor de água e metal da amostra (Scalbert, 1992).

O método da vanilina e do DMACA (*p* - dimetilaminocinmaldeído), baseia-se na determinação de taninos pela formação de aductos coloridos a partir da reação entre os taninos e aldeídos. Na reação com o reagente DMACA, a presença de polifenóis monoméricos, causam um risco potencial de sobrestimar o teor de taninos (McMurrough e McDowell, 1978). Enquanto na reação com a vanilina observou-se uma falta de reprodutibilidade nos ensaios (Sun *et al.*, 1998a). O método da vanilina envolve a reação do aldeído aromático com o anel meta substituído por grupos hidroxilo dos flavanóis produzindo um aducto vermelho com absorvância máxima a 500 nm, como demonstrado na figura 2 (Broadhurst e Jones, 1978).

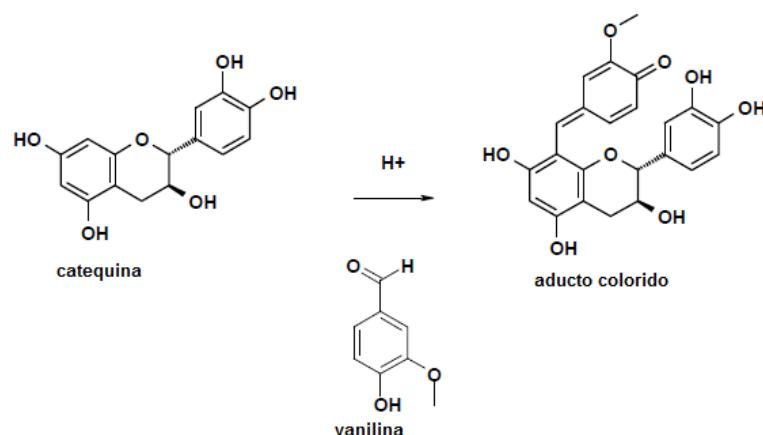


Figura 2 – Reação da vanilina com 3-flavanól monomérico produzindo um aducto vermelho com absorvância máxima a 500 nm. (www.users.muohio.edu/hagermae/)

Sun *et al.* (1998a) com o objetivo de assegurar a reprodutibilidade do método da vanilina estudou a influência dos principais fatores que o afetam.

Interferentes: aplicando a reação da vanilina com compostos não-flavonóides, observaram que antocianinas e malvidina 3-glicosídeo não reagem com vanilina em baixa concentração. No entanto, em meio ácido, antocianinas absorvem em torno de 490-540 nm, o que coincide com a absorvância em 500nm (A_{500}) do produto colorido formado pelo método. Esta interferência é eliminada utilizando um ensaio em branco, onde não houve a adição de vanilina (Broadhurst e Jones, 1978).

Natureza do ácido: comparando HCl e H_2SO_4 a várias concentrações, verificou-se que a A_{500} com H_2SO_4 foi muito superior, indicando uma maior sensibilidade para o método. Embora maiores concentrações ácidas possam aumentar a intensidade colorimétrica, há o risco da ocorrência de associação da vanilina e de decomposição das proantocianidinas (Broadhurst e Jones, 1978).

Concentração do ácido: se a concentração de H_2SO_4 for superior a 10,6%, a utilização como referência de (+)- catequina sobrestima o teor de proantocianidinas. Já se a concentração de H_2SO_4 for inferior 10,6% (+)-catequina subestima o teor proantocianidinas. Assim, para análise total de catequinas e proantocianidinas em uma amostra, sem a separação preliminar destas, deve-se usar H_2SO_4 com concentração de aproximadamente 10% e neste caso, (+)-catequina pode ser utilizado como padrão de referência.

Tempo de reação: foi fixado em 15 min para a determinação das catequinas, visto atingirem o valor máximo entre 5-10 min e permanecerem estáveis até cerca de 20 min. No caso das proantocianidinas a A_{500} alcança um máximo e em seguida decresce gradualmente, assim sendo, toma-se o valor máximo obtido, independente do tempo.

Temperatura: a temperatura estabelecida para estimar as catequinas ronda entre os 25-30°C, visto verificar um aumento da A_{500} com o acréscimo desta, ao contrário do que

ocorre com as proantocianidinas, onde, esta não influencia, desde que não seja significativamente alterada, e portanto, a estimativa das proantocianidinas pode ser realizada à temperatura ambiente.

Teor de água: optou-se pela utilização de metanol como solvente, descartando a hipótese de empregar ácido acético glacial, visto as proantocianidinas não se dissolvem neste meio. A ausência absoluta de água como solvente, não só estabiliza a cor, mas também aumenta significativamente a sensibilidade, já que a A_{500} diminuiu rapidamente com o aumento do teor de água, pois esta depende da concentração de ácido.

Concentração da vanilina: a vanilina deve estar em excesso, para certificar-se que a reação seja completa. A_{500} não altera em concentrações iguais ou superiores a 10 g/L, recomenda-se uma concentração entre 10-12 g/L de vanilina. Maiores concentrações devem ser evitadas, devido a ocorrência de auto-condensação da vanilina em meio ácido produzindo produtos coloridos.

Exposição à luz: recomenda-se que o método seja realizado sob luz difusa, visto não haver diferenças significativas ao nível de 5% entre a reação da vanilina no escuro e quando submetida à luz solar difusa.

O índice de gelatina proposto por Glories, (1984) onde os taninos são classificados pela sua tendência para precipitarem com gelatina, apresenta falta de reprodutibilidade, devido a variabilidade na composição e pureza da gelatina.

A metodologia de Adams-Harbertson para a quantificação de taninos - método BSA - é uma modificação do método de Hagerman e Butler, (1978). O precipitado tanino-proteína formando pela adição de albumina de soro bovino (BSA), volta a ser solubilizado e quantificado indirectamente, pela adição de FeCl_3 e medição da absorvância a 510 nm. A modificação na etapa de precipitação pela adição de bissulfito permite a quantificação adicional de duas classes de pigmentos poliméricos presentes em vinhos: pequenos pigmentos poliméricos e grandes pigmentos poliméricos (Harbertson, Picciotto e Adams, 2003).

A medição da inibição da enzima fosfatase alcalina pela sua interação com taninos é outro método indirecto. Apresenta como desvantagens detectar somente taninos com mais de três subunidades flavan-3-ol e as características físico-químicas do precipitado formado não serem bem conhecidas (Ittah, 1991; Adams e Harbertson, 1999).

Todos os métodos de precipitação por proteínas são prejudicados pela impossibilidade de medir directamente os taninos absorvidos. Dado a absorvância ideal para a quantificação de taninos, a cerca de 280 nm sofrer a interferência das proteínas adicionadas (Herderich, 2005) (Sarneckis, 2006). Além de ser dependente de muitas variáveis, incluindo pH, ponto isoelétrico, força iônica, conformação da proteína e temperatura (de Freitas e Mateus, 2001).

Com o objetivo de contornar estas desvantagens acima mencionadas, Sarneckis *et al.* (2006), desenvolveram um método de precipitação por polímeros não proteicos, baseado no método de Montedoro e Fantozzi, (1974).

O método baseia-se na precipitação de taninos por metil-celulose (método MCP) e a sua determinação é feita pela subtração da absorvância a 280 nm dos compostos fenólicos antes e após a precipitação dos taninos. Apresenta como vantagem não sofrer interferência de outros compostos fenólicos que absorvem a 280 nm, como as antocianinas e catequinas. A sua otimização e validação também foram efetuadas:

Efeito do pH, concentração de etanol e do sulfato de amónio: a variação do pH (3,2-7,4), concentração do etanol (10-50%) e o aumento na concentração de sulfato de amónio não afetaram o desempenho do método;

Efeito da concentração e composição da metil celulose: o aumento da concentração de metil-celulose removeu proporcionalmente mais taninos, enquanto a variação na viscosidade do polímero (15-400 cP) não interferiu na A_{280} . A solução de metil celulose 0,04% não removeu antocianinas, já a solução a 0,4% removeu até 5% das antocianinas mais hidrofóbicas, assim, a solução de metil celulose 0,04% foi escolhida para o método;

Efeito do tempo de reação: um mínimo de 10 minutos para permitir a precipitação completa dos taninos. Neste período o ensaio deixado em repouso à temperatura ambiente e não centrifugado conferiu uma melhor reprodutibilidade;

Validação para o vinho tinto: o método desenvolvido apresentou uma boa correlação com o método de referência por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tendo um coeficiente de correlação de 0,74 para 121 amostras de vinhos tintos e coeficiente de variação de 3%.

2.2.2 Métodos cromatográficos

Na análise cromatográfica, uma elevada aplicação de métodos por HPLC, principalmente em fase reversa (Labarbe *et al.*, 1990; Ricardo da Silva *et al.*, 1991; Saucier *et al.*, 2001; Cozzolino, *et al.*, 2004; Fournand *et al.*, 2006), e em menor quantidade por fase normal (Saucier *et al.*, 2001), e em muitos estudos acoplados com espectrometria de massa (Souquet *et al.*, 1996; Fulcrand *et al.*, 1999; Peng *et al.*, 2001; Monagas *et al.*, 2003; Mattivi *et al.*, 2009) tem sido desenvolvidos para a quantificação dos taninos da uva.

HPLC em fase reversa permite separar somente proantocianidinas de baixo peso molecular, enquanto oligómeros e polímeros são co-eluídos como um largo pico sem resolução (Rigaud *et al.*, 1993).

HPLC em fase normal tem sido aplicada para a separação das proantocianidinas a partir das grainhas de uva até trimeros (Rigaud *et al.*, 1993), dos vinhos tintos até pentâmeros (Lazarus *et al.*, 1999) e da película da uva (Souquet *et al.*, 1996). Entretanto a

separação de proantocianidinas das uvas e vinhos por HPLC em fase normal apresenta uma resolução muito baixa quando comparada com a em fase reversa, e acentua conforme aumenta a massa molecular dos taninos condensados (Sun e Spranger, 2005).

2.2.3 Fracionamento e isolamento

Para a quantificação e caracterização das proantocianidinas individuais a despolimerização após o enriquecimento é amplamente empregada. Este método determina a natureza e a concentração das unidades terminais e de extensão e consequentemente determina o grau médio de polimerização e a percentagem de proantocianidinas esterificadas com ácido gálico. A maioria dos conhecimentos atuais sobre a composição geral e estrutura dos taninos da uva foi obtida por este método (Sun e Spranger, 2005).

Para a caracterização dos taninos, estes primeiramente necessitam de ser extraídos a partir de amostras de uvas ou vinho com solventes, antes que possam ser isolados e / ou fracionados por extração em fase sólida principalmente por fase reversa, mas também por extração líquido-líquido (Cheynier e Fulcrand., 2003).

Vários métodos têm sido desenvolvidos para o fracionamento e isolamento das proantocianidinas:

Extração líquido-líquido com acetato de etila para isolar proantocianidinas oligoméricas apresenta uma baixa recuperação. Sun e Spranger (2005) observaram que somente procianidinas dimericas foram extraídas com este eluente, além de extrair pequenas quantidade de antocianinas que podem interferir nas análises de proantocianidinas.

Lea *et al.* (1979) após a realização de uma pré-purificação do extrato do vinho, em coluna Sephadex LH-20. Efetuou a extração líquido-líquido por cromatografia em contracorrente permitiu a partição entre duas fases líquidas, água e acetato de etila. Esta técnica permitiu uma semi-quantitativa determinação de monómeros, dímeros, oligómeros até tetrâmeros e polímeros de procianidinas de vinhos brancos

Mais recente Saucier *et al.* (2001) desenvolveram um método envolvendo o mesmo princípio de extração líquido/líquido e solubilidade relativa das proantocianidinas em diferentes solventes (água, acetato de etila, metanol e clorofórmio), o que permitiu o seu fracionamento em várias frações, no entanto observou-se sobreposições entre as mesmas.

Labarbe *et al.* (1990) desenvolveram um método envolvendo precipitação seletiva para o fracionamento das proantocianidinas. Uma pré-purificação em coluna Sephadex LH-20, aplicando a metodologia desenvolvida por Souquet *et al.*, (1996), seguida da precipitação das proantocianidinas em clorofórmio/metanol, finalmente, estas foram depositados sobre uma coluna contendo lã de vidro e sequencialmente eluídos pelo aumento da proporção de metanol do eluente, obtendo frações de proantocianidinas com

diferentes graus de polimerização. A quantificação destas permitiu estimar a distribuição polimérica e a proporção de unidades de prodelphinidinas, bem como da taxa de galoilação.

Remy *et al.* (2000) aplicando novamente a metodologia de Souquet *et al.*, (1996) separou os taninos dos vinhos utilizando uma coluna Toyopearl TSK HW-50 (f) em duas fracções. A primeira possuía essencialmente monómeros e a segunda, principalmente compostos oligoméricos e poliméricos. Entretanto, traços de proantocianidinas oligoméricas e pigmentos poliméricos estavam presentes nas duas fracções.

Meirelles *et al.* (1992) estimaram os teores de proantocianidinas esterificadas por ácido gálico vinhos tintos, pela quantificação das diferentes fracções (monômeros, oligómeros e polímeros), obtidas pelo fracionamento sobre uma coluna Toyopearl TSK HW-50 (f).

Posteriormente, Sun *et al.* (1998b) desenvolveram um método para o fracionamento das proantocianidinas de acordo com o seu grau de polimerização sob fase reversa utilizando cartucho Sep-Pak C18. As três fracções de flavan-3-ols das uvas e vinhos, nomeadamente, 3-flavanóis monoméricos (FI), proantocianidinas oligoméricas (FII) e poliméricas (FIII) foram separadas por eluições sucessivas, primeiramente com água para a eliminação dos ácidos fenólicos, seguido de eluições com acetato de etilo para eluir FI e FII e por último com metanol obtendo FIII e antocianinas. A separação de FI e FII foi efetuada por eluição sequencial com éter dietílico e metanol.

Este cartucho permite a remoção dos açúcares e outros compostos altamente polares como ácidos orgânicos, aminoácidos, e proteínas por eluição com água, além de uma significativa redução dos solventes. A principal limitação dos cartuchos SPE é que não realiza a separação das proantocianidinas poliméricas de antocianinas e pigmentos poliméricos (Cheynier e Fulcrand., 2003).

No ano seguinte, Sun *et al.* (1999) aprimoraram um método de isolamento e purificação de procianidinas de baixo (dímeros e trímeros) de grainhas de uva, pela inclusão de um pré-fracionamento do extrato fenólico sobre uma coluna LiChroprep RP-18, que permitiu a remoção das proantocianidinas poliméricas por eluição com metanol, de forma a evitar a colmatção da coluna Toyopearl TSK HW-40 (F) onde o fracionamento das procianidinas dimericas e trimericas foi empregando metanol como fase móvel

Vidal *et al.* (2002), no estudo de monitorização das mudanças no comprimento da cadeia de proantocianidinas em soluções modelo de vinho. Extratos de proantocianidinas da película e grainha das uvas foram fracionados sobre Toyopearl TSK HW-50 (F), ocorrendo a eluição dos monómeros e oligómeros, seguida da eluição das proantocianidinas com solução de acetona / água. O método de Sun *et al.*, (1998b) foi modificado e aplicado no fracionamento das proantocianidinas monoméricas e poliméricas em cartuchos Sep-Pak C18. Monómeros foram eluídos com éter dietílico enquanto os oligómeros e polímeros foram

eluídos com metanol, diminuindo assim, a duração da análise quando comparado ao método original.

Mais recentemente, Passos *et al.* (2010) no estudo da estimacão do grau médio de polimerizacão das procianidinas das grainhas de uva, efetuaram o fracionamento em uma coluna SPE-C18, da fase orgânica resultante de uma extração líquido-líquido com acetato de etila / água.

Alguns estudos de cromatografia em fase normal também têm sido empregue para o fraccionamento de proantocianidinas Rigaud *et al.* (1993), utilizando uma coluna de sílica com um gradiente de misturas de diclorometano-metanol-água-ácido fórmico como eluente, conseguindo a eluição de procianidinas em ordem crescente de peso molecular. Posteriormente Lazarus *et al.* (1999) aplicaram colunas Supelcosil Envi-18 para o fracionamento por fase normal de extratos de grainhas de uva e de vinhos tintos.

2.3 Espectrometria de infravermelho – Considerações gerais

No espectro eletromagnético a região do infravermelho (IV) encontra-se entre as gamas do visível e microondas, e subdivide-se em infravermelhos próximos (12500 - 4000 cm^{-1} ou 800 – 2500 nm), médios (4000 – 400 cm^{-1} ou 2500 – 25000 nm) e longínquos (400 – 100 cm^{-1} ou 25 – 100 μm) para leituras em números de onda e em comprimentos de onda respetivamente (Bertrand e Dufour, 2000).

A energia desta radiação electromagnética está relacionada com as ligações covalentes. Estas não possuem energia suficiente para excitar os elétrons e provocar transições eletrónicas, mas fazem com que os átomos (ou grupos de átomos) vibrem com maior rapidez e com maior amplitude em torno das suas ligações, o que induz a transição do estado vibracional fundamental para o estado excitado das mesmas. Os eletrões, ao retornarem ao estado original, liberam esta energia, que então é detectada pelo espectrómetro.

Estas ligações químicas possuem uma frequência natural específica, que deve ser a mesma que a da radiação incidente de modo a haver absorção. Além da frequência natural, outro fator principal, é que estas ligações tenham um momento de dipolo que muda em função do tempo (Skoog, Holler e Nieman, 2002; Bauer *et al.*, 2008).

Os dois tipos principais de vibrações moleculares são classificados em vibração de deformação axial ou estiramento (*stretching*) e vibração de deformação angular (*bending*). As vibrações de estiramento envolvem uma mudança contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre os dois átomos, podendo ser de dois tipos: estiramento simétrico (ν_s) e estiramento assimétrico (ν_{as}). As vibrações de deformação angular são caracterizadas pela mudança do ângulo entre duas ligações e podem ocorrer no plano ou fora do plano da molécula. São comuns quatro tipos de vibrações fundamentais descritas

como tesoura (*scissoring*), balanço (*rocking*), sacudida (*wagging*) e torção (*twisting*), demonstrados na Figura 3 (Skoog *et al.*, 2002).

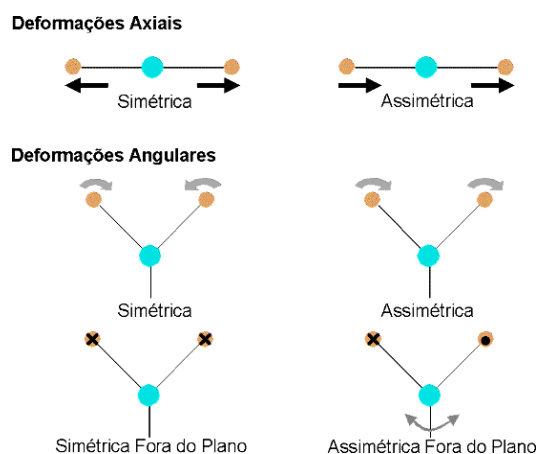


Figura 3 - Modos de vibração molecular. Os sinais X e • indicam movimentos para dentro e para fora do plano do desenho, respectivamente (<http://www.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm>).

2.3.1 Infravermelho por transformada de Fourier

A espectrometria FTIR é baseada na medição das frequências de ligações químicas em grupos funcionais, tais como C–C, C–H, O–H, C=O and N–H. As bandas de absorção na região MIR estão associadas as transições que ocorrem do estado fundamental para o primeiro estado excitado. (Skoog *et al.*, 2002).

Embora por muitos anos a espectroscopia vibracional para análise do vinho no MIR tenha encontrado uma aplicação mais limitada do que na região NIR, ela recentemente ganhou muita atenção com base nas suas vantagens potenciais sobre NIR para a análise de alimentos (sensibilidade e selectividade superior), bem como devido à evolução instrumental e técnica (Soriano *et al.*, 2007; Pizarro *et al.*, 2011).

O componente mais importante da espectroscopia no FTIR é o interferómetro de Michelson. O interferómetro é constituído por dois espelhos (um fixo e outro móvel) e por um divisor de feixe (*beam splitter*), geralmente composto de um cristal de KBr. A principal propriedade deste divisor é reflectir 50% da radiação e transmitir os outros 50%.

Um dos feixes da fonte segue em direcção a um espelho de posição fixa no qual ele se reflecte para o divisor de feixe e volta a dividir-se e parte deste feixe vai para o detector. O outro feixe parte do divisor de feixe em direcção ao espelho móvel, este espelho também reflecte, ocorrendo uma nova divisão pelo *beam splitter* e parte da radiação segue também para o detector. Quando os feixes se recombinaem, ao passarem pela segunda vez no divisor de feixe, criam uma onda modulada. A modulação do sinal resulta do atraso no percurso óptico de uma onda em relação à outra, que varia pelo movimento do espelho móvel, possibilitando assim, percorrer todos os comprimentos de onda em estudo com rapidez.

O resultado final é um interferograma, ou seja, um gráfico de energia em função do deslocamento do espelho, formado pela soma de todas as ondas de diferentes amplitudes e frequências que chegam ao interferômetro. Contudo, apesar de o interferograma conter toda a informação fornecida pelo espectrofotômetro, a forma como a apresenta não é muito útil, assim esta informação é convertida num espectro, relacionando as intensidades de energia com as respectivas frequências (número de onda), através da transformada de Fourier (FT). Um esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson do espectrofotômetro FTIR pode ser visualizado na Figura 4 (Skoog *et al.*, 2002; Helfer *et al.*, 2006).

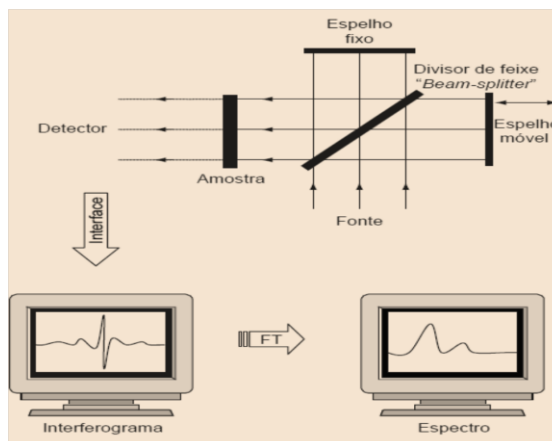


Figura 4 - Esquema ilustrativo para o interferômetro de Michelson e do espectro resultante da aplicação da FT (Helfer *et al.*, 2006).

2.3.2 Aplicações da espectrometria FTIR em viticultura e enologia

A espectrometria FTIR é um método analítico indirecto, por isso é necessário primeiramente calibrar o equipamento com métodos analíticos de referência/rotina para os diferentes compostos a determinar (Patz *et al.*, 2004; Moreira e Santos, 2004). A concentração de uma dada substância a ser determinada, é diretamente proporcional à sua absorvância a um dado comprimento de onda, de acordo com a lei de Beer-Lambert (Skoog *et al.*, 2002).

A relação acima mencionada é afetada pela presença de outros compostos que absorvem energia no mesmo comprimento de onda; deste modo, espera-se que a calibração analítica de compostos presentes em baixas concentrações deva ser afetada por outros compostos presentes em concentrações mais elevadas com bandas de absorção muito próximas ou idênticas.

Esta situação foi observada por Moreira e Santos (2004), num estudo que teve como objetivo avaliar os interferentes na determinação de parâmetros de rotina do vinho. Pela análise da calibração dos açúcares totais, com amostras analisadas antes e após a adição de um analito, obteve-se uma boa recuperação pela adição de glicose em vinhos doces.

O mesmo resultado não se verificou nos vinhos secos. A glucose e a frutose possuem bandas de absorção no IR semelhantes às dos ácidos orgânicos (C-O e O-H), que estão em concentrações superiores aos açúcares, em vinhos secos. Os piores resultados foram obtidos na acidez volátil pela adição de ácido acético, podendo ser causado pela baixa especificidade do espectro infravermelho do mesmo. Este composto possui ligações C-H de CH₃, assim como o etanol.

Tendo em consideração a presença de interferentes na matriz do vinho para a quantificação do etanol, como a absorção da água em números de onda inferiores a 900 cm⁻¹ e a banda de absorção em 1030 cm⁻¹ do metanol, Gallignani *et al.* (2005) desenvolveram um método automatizado para a determinação do etanol pela medição da absorção em 877 cm⁻¹, através da sua extração com clorofórmio, utilizando um sistema de injeção em fluxo e FTIR.

Moreira e Santos (2005) observaram que as semelhanças entre os espectros de IV dos ácidos orgânicos causam interferências espectroscópicas na quantificação dos mesmos. A região entre 1728 - 1732 cm⁻¹, associada ao estiramento da ligação C=O dos ácidos carboxílicos, foi empregue na determinação da acidez total, do ácido tartárico e málico. Já em relação à acidez volátil, a banda mais relevante para a calibração foi em 1385 cm⁻¹ (flexão O-H do ácido carboxílico ou flexão CH₃) e para o ácido cítrico em 1393 – 1397 cm⁻¹ (flexão O-H do ácido carboxílico).

Tem sido demonstrado por vários estudos que os modelos de calibração inseridos nos instrumentos FTIR necessitam de ser avaliados, e na maioria dos casos, reconstruídos. Este fenómeno observou-se na análise de amostras provenientes de origens geográficas não incluídas nos modelos de calibração original. Isto foi verificado para vários parâmetros de rotina de vinhos alemães (Patz *et al.*, 2004), vinhos franceses (Dubernet e Dubernet, 2000), vinhos portugueses (Moreira *et al.*, 2002) e para mostos de uvas da África do Sul (Swanepoel, du Toit e Nieuwoudt, 2007).

A espectrometria FTIR tem sido aplicada com sucesso para o monitoramento das fermentações de mosto. Wynne *et al.* (2007) demonstraram que a aplicabilidade desta técnica, modelada com o auxílio de técnicas bidimensionais de correlação, permitia monitorar as alterações de composição da glicose, da frutose e do álcool durante a fermentação. Além disso, demonstraram que as taxas de conversão da frutose e da glucose em álcool foram diferentes, tendo sido a última mais rápida.

Esta técnica também foi utilizada também no desenvolvimento de calibrações para o monitoramento das fermentações em larga escala. Mais recentemente, o mesmos autores estudaram a aplicabilidade da mesma para detectar os primeiros indícios de problemas de fermentação do vinho (Urtubia *et al.*, 2004; 2008).

Versari, Boulton e Thorngate (2004) obtiveram um modelo de regressão para o total de antocianinas livres, das antocianinas copigmentadas, da fração de pigmentos poliméricos e da cor total em vinhos tintos. Mais recentemente, Soriano *et al.*, (2007), desenvolveram a determinação de antocianinas monoméricas.

Foram desenvolvidos modelos para a predição de dois parâmetros essenciais do ponto de vista da qualidade dos vinhos: acidez total e acidez volátil. A faixa espectral foi limitada entre 1188-1485 e 2503-2951 cm^{-1} após a remoção das bandas saturadas, não-informativas e com ruído. A seleção da região de 2503 a 2951 cm^{-1} , é consistentemente justificada, dado ser uma região de vibrações típicas decorrentes de ácidos orgânicos. Estes são caracterizados por uma ampla banda de estiramento O-H entre 2500 a 3500 cm^{-1} , que é também sobreposta às vibrações de estiramento C-H. Certas absorções entre 1188 - 1485 cm^{-1} , estão associadas a coexistência de absorções correspondentes a grupos alifáticos (flexão CH_2 e estiramento CH_3) (Pizarro *et al.*, 2011).

A aplicabilidade da espectrometria FTIR também tem sido estudada para os componentes quantitativamente minoritários do vinho. Schneider *et al.* (2004) aplicaram esta técnica para a determinação dos precursores de aroma do bago de uva. Devido a sensibilidade e seletividade requerida pelo instrumento, uma pré-purificação em resina, seguida de extração por fase reversa foi necessária.

No caso dos polissacarídeos, a quantificação das manoproteínas foi efetuada utilizando a região espectral entre 1200 e 1800 cm^{-1} (Coimbra *et al.*, 2005). Mais recentemente Boulet *et al.* (2007) apresentaram os espectros MIR das principais famílias de polissacarídeos do vinho: manoproteínas, arabinogalactana-proteínas, RG-I e RG-II, verificando que cada uma possui um perfil característico, além de uma variabilidade dentro de cada grupo. O pico em cerca de 1045 cm^{-1} observado, é associado as ligações C-O-C e C-O-H. Os picos em 1130 e 980 cm^{-1} estão relacionados as ligações glicosídicas. Verificou-se, também, que a presença de ácidos urónicos mais ou menos esterificados resultam em uma maior absorção entre 1200 e 1800 cm^{-1} .

Visto esta investigação ser sobre a quantificação dos taninos em vinhos tintos, uma maior ênfase será dada sobre os mesmos.

As absorções dos principais componentes do vinho na mesma região espectral dos taninos, como o etanol e os ácidos orgânicos, dificultam a aplicação da espectroscopia no infravermelho para a sua determinação (Moreira e Santos *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2008).

Fernández e Agosin, (2007), desenvolveram uma metodologia para a quantificação dos taninos dos vinhos e o seu respectivo grau médio de polimerização (GMP) utilizando extratos fenólicos, obtidos por fase reversa. Também foram aplicados procedimentos de seleção de intervalos espectrais. A banda de absorção observada em cerca de 3400 cm^{-1} está associada às vibrações de estiramento O-H e C-H. Os picos verificados na zona de

fingerprint, entre 800 - 1800 cm^{-1} , estão associados ao estiramento do anel aromático C=C-C (1580-1615 cm^{-1} ; 1450-1510 cm^{-1}) e as várias vibrações de flexão C-H aromáticas - fora do plano (670-900 cm^{-1}) e no plano (950-1225 cm^{-1}). O pico em cerca de 1285 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-O decorrente da estrutura do anel pirano derivado dos taninos.

Considerando a dificuldade na quantificação de taninos - devido às interferências espectrais de outros componentes dos vinhos já acima mencionadas - uma maneira de remover interferentes ou regiões não informativas do espectro infravermelho, é a aplicação da seleção de variáveis, pela qual os modelos podem ser melhorados e por consequência melhorar a precisão da determinação.

Neste contexto, Jensen *et al.*, (2008) aplicaram métodos de seleção de variáveis para a identificação das regiões mais importantes do espectro na quantificação de taninos. Os sinais mais acentuados nos espectros dos taninos da uva foram novamente verificados: dois picos em 1520 e 1445 cm^{-1} , um pico a 1285 cm^{-1} e vários picos entre 1400-1050 cm^{-1} , sendo este último, nas regiões de sobreposição do estiramento O-H e da deformação dos fenóis e deformações C-H nos compostos aromáticos.

As regiões identificadas pelos diferentes métodos de seleção não foram idênticas, mas todas incluíram duas regiões: a região entre 1060-995 cm^{-1} , que foi dominada pela alta absorção do estiramento O-H do etanol, e a região entre 1485-1425 cm^{-1} , associada aos taninos de uva, o que concluiu-se ser particularmente importante para a quantificação de taninos.

Passos *et al.* (2010) estudaram modelos de regressão para a estimação do GMP em extratos das procianidinas de gráinha de uva na região MIR. A região espectral utilizada foi entre 1800-700 cm^{-1} , onde estão presentes as bandas de éster, aromáticos, álcool e éter. São esperadas mudanças nas bandas do anel aromático das procianidinas nesta gama. O extrato de procianidinas foi gradualmente fracionado por precipitação com metanol/clorofórmio e posteriormente utilizado para a construção do modelo de calibração. Pela utilização deste modelo resultante foi possível estimar o GMP das procianidinas, e correlacionar o aumento dos picos de absorbância a 1203 e 1099 cm^{-1} com o aumento do GMP, devido à maior proporção de substituições no anel aromático das moléculas polimerizadas das procianidinas.

A espectrometria FTIR no NIR também tem sido utilizada para a determinação dos taninos da uva. Ferrer-Gallego *et al.*, (2010; 2011), desenvolveram modelos de calibração para a predição dos teores de flavanóis em gráinhas e películas de uva a partir de 84 amostras.

As aplicações citadas acima entre outras da espectroscopia no FTIR na região do MIR em viticultura e enologia estão descritas no quadro 1.

Quadro 1 - Aplicações da espectrometria FTIR na região do MIR em viticultura e enologia. Elaborado pelo autor.

Aplicações	Referências
Caracterização dos polissacarídeos do vinho	Coimbra et al., 2005; Boulet et al., 2007
Determinação do etanol em vinhos	Gallignani <i>et al.</i> , 2005
Determinação dos ácidos orgânicos em vinho	Moreira e Santos, 2005
Estimação do GMP das procianidinas da uva	Passos et al., 2010
Determinação dos parâmetros de análise de rotina do mosto, vinho ¹	Dubernet e Dubernet, 2000; Edelmann <i>et al.</i> , 2001; Moreira e Santos, 2004; Patz <i>et al.</i> , 2004; Urtubia <i>et al.</i> , 2004; Moreira e Santos, 2005; Swanepoel <i>et al.</i> , 2007; Wynne <i>et al.</i> , 2007; ; Urtubia <i>et al.</i> , 2008; Fu et al., 2009
Determinação dos precursores glicosídicos da uva	Schneider <i>et al.</i> , 2004
Predição da capacidade antioxidante total dos vinhos tintos	Versari <i>et al.</i> , 2010
Determinação do glicerol em vinhos	Dixit <i>et al.</i> , 2005
Determinação da acidez total e volátil nos vinhos	Pizarro <i>et al.</i> , 2011
Determinação de componentes da cor dos vinhos tintos	Versari, Boulton e Thorngate, 2004; Soriano <i>et al.</i> , 2007
Quantificação dos taninos totais e o seu GMP em vinhos tintos	Fernández e Agosin, 2007
Identificação das regiões espectrais para a quantificação de taninos do vinho tinto	Jensen <i>et al.</i> , 2008
Determinação da estabilidade coloidal em vinhos	Versari <i>et al.</i> , 2011
Determinação do azoto assimilável em mostos	Dubernet <i>et al.</i> , 2001; Dimitris, 2010

¹ Por parâmetros de análise de rotina entende-se: etanol, densidade, extrato seco, açúcares redutores, glucose, frutose, acidez total, acidez volátil, pH, SO₂ livre e total, Índice de polifenóis totais, ácidos orgânicos (ácido málico, tartárico, láctico, succínico e cítrico).

2.4 Quimiometria

A quimiometria é uma área que se refere à aplicação de métodos matemáticos e estatísticos às ciências químicas de modo a obter um delineamento óptimo dos procedimentos experimentais, bem como, obter informações sobre o sistema através dos dados químicos e físicos obtidos (Massart *et al.*, 1997; Naes *et al.* 2002).

Com o desenvolvimento crescente das técnicas instrumentais, impulsionado pela expansão da microinformática no laboratório químico, tornaram-se necessários tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de relacionar os

sinais obtidos com os resultados desejados (concentrações). O manuseio de elevado número de dados, essencialmente de natureza multivariada é executada por quimiometria, com recurso a softwares específicos.

De um modo mais específico, recentemente a quimiometria combinada com a espectrometria FTIR, tem sido amplamente utilizada para fins de quantificação na indústria vinícola, nomeadamente na determinação dos parâmetros analíticos de controlo (Moreira *et al.*, 2002; Patz *et al.*, 2004) bem como no monitoramento das fermentações (Wynne *et al.*, 2007; Urtubia *et al.*, 2008).

2.4.1 Calibração multivariada

Os parâmetros quantitativos da amostra são determinados por meio de um modelo matemático de predição obtido por calibração multivariada. Tomando como exemplo o nosso estudo, um conjunto de amostras com composição conhecida (variáveis independentes) fornecem “n” espectros de vinhos em “p” comprimentos de onda diferentes, formando uma matriz X (n,p). A matriz Y (n,q) com os valores de concentração (variáveis dependentes) possuem “n” linhas, correspondendo às diferentes amostras, e “q” colunas, indicando as quantidades presentes nas amostras. A base da calibração multivariada é estabelecer uma relação entre estas duas matrizes de dados, para a construção de um modelo matemático que melhor possa reproduzir Y a partir dos dados da matriz X (Peralta-Zamora *et al.*, 1997)

Há uma série de vantagens na utilização da calibração multivariada quando comparada com a calibração univariada, sobretudo em amostras mais complexas com número acentuado de sobreposição de bandas: possibilita determinações simultâneas de mais de um analito; normalmente é mais robusto a pequenas mudanças nos parâmetros experimentais ou instrumentais, tais como intensidade da temperatura e pH; permite contornar problemas associados à interferência espectral, principalmente quando a informação analítica disponível não apresenta elevada selectividade; amostras anómalas são mais facilmente localizados e avaliadas (Wiberg, 2004)

Existem vários métodos matemáticos para a realização da calibração multivariada, como a regressão linear múltipla, a regressão de componentes principais e o método dos mínimos quadrados parciais.

2.4.1.1 Análise de Componentes Principais

A análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* - PCA) é uma técnica quimiométrica que visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados originais multivariados (matriz X), preservando a maior quantidade de informação estatística (variância) possível. Os gráficos obtidos representam as amostras num sistema cartesiano,

possibilitando a interpretação multivariada de conjuntos de dados elevados e complexos por meio de gráficos bidimensionais ou tridimensionais (Peralta-Zamora *et al.*, 1997; Esbensen, 2002; Wiberg, 2004).

A redução da matriz original é obtida pela decomposição sucessiva desta, em produtos das matrizes *scores* (t) e *loadings* (p) e na matriz que contém os resíduos (E), estimando-se novas variáveis denominadas componentes principais (PC) ou fatores. Após a determinação de cada PC a nova matriz recebe os resíduos da anterior antes de ser realizada uma nova decomposição, tal como é representado na figura 5 (Esbensen, 2002; Wiberg, 2004).

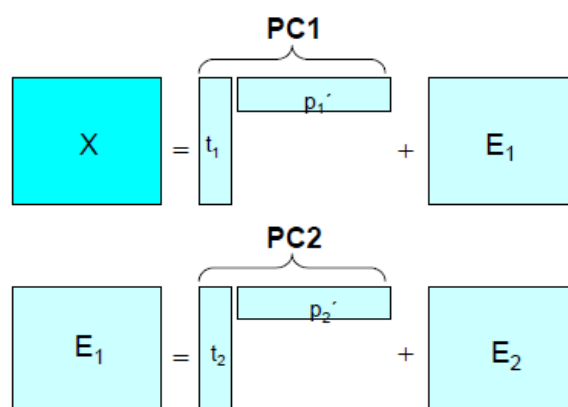


Figura 5 - Esquemática descrição da decomposição da matriz X com PCA utilizando dois PC. (Adaptado de Wiberg, 2004).

Os PC são combinações lineares das variáveis originais, todos ortogonais entre si, e portanto não correlacionados. Estes são obtidos por ordem decrescente de variância, sendo esta descrita pelo valor próprio. No que respeita aos resíduos do modelo, estes são tanto menores quanto maior o número de PC usados no modelo, uma vez que com o aumento do número de PC aumenta a quantidade de informação retida e diminui a quantidade de resíduos. A estimação do número de PC significativos pode ser obtida por diferentes métodos, sendo o mais frequente a validação cruzada (Wiberg, 2004).

Os *loading* formam uma nova base ortonormal que explica os dados de X onde a projeção dos dados nesta base é denominada de *scores*. Os *loadings* são os coeficientes pelos quais as variáveis originais devem ser multiplicadas para obter o PC, sendo que o valor numérico do *loading* determina a influência de uma variável (Esbensen, 2002).

Para ilustrar o significado dos vectores t (vectores scores) e p (vectores loadings) a Figura 6 mostra no plano bidimensional, duas variáveis x_1 e x_2 . Onde esta representado na figura abaixo o PC, que é a recta que aponta para a direcção de maior variabilidade de amostras da figura b. Os vectores scores (t) são as projecções das amostras na direcção do

componente principal e os loadings (p) são os cosenos dos ângulos formados entre o componente principal e cada variável (Wiberg, 2004).

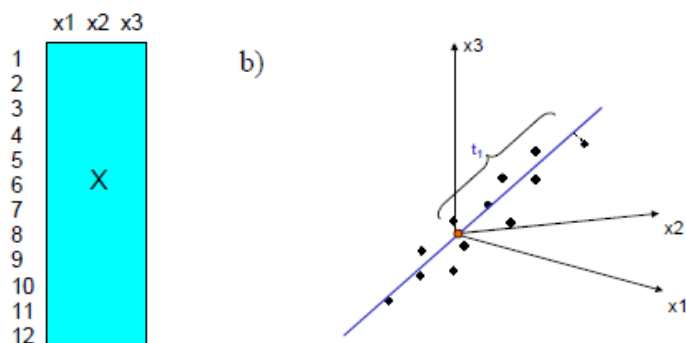


Figura 6 - Interpretação gráfica de um modelo de PCA consistindo de um PC: a) Dados do conjunto composto por doze objetos e três variáveis, b) uma interpretação geométrica do PC calculado a partir do conjunto de dados (Adaptado de Wiberg, 2004).

Os scores de cada amostra podem também serem representados graficamente constituindo um mapa de PC. Este mapa permite o agrupamento de amostras com características semelhantes e detectar outliers, isto é, amostras que por algum motivo não pertencem ao sistema.

A técnica PCA é normalmente utilizada na selecção de amostras para a construção de modelos de calibração, como na identificação de grupos de amostras com características semelhantes, bem como na verificação de quais dos parâmetros analisados (variáveis) são os principais responsáveis pela formação dos grupos de amostras.

2.4.1.2 Regressão por Mínimos Quadrados Parciais

A regressão por mínimos quadrados parciais ou *Partial Least Squares* (PLS) é muito similar à PCA, a diferença, encontra-se na forma como as novas variáveis são encontradas. Ao invés de efectuar a decomposição sucessiva somente dos dados da matriz X (absorbâncias), esta também ocorre com a matriz Y (concentrações) (Naes *et al.*, 2002, Wiberg, 2004).

A regressão PLS1 é usada para estabelecer uma relação entre um conjunto de variáveis independentes X e uma variável dependente y , aplicada normalmente nos casos em que o número de variáveis (dependentes e independentes) é elevado. Este procedimento executa uma PCA por meio do algoritmo NIPALS (mínimos quadrados parciais não linear iterativo) na matriz de variáveis independentes, maximizando ao mesmo tempo, a correlação dos PC(s) extraído com o vetor da variável dependente. A relação é formalizada por meio da equação:

Onde y é o vetor da variável dependente, X é a matriz das variáveis independentes, b é o vetor de coeficientes de regressão, e E representa o erro não contabilizado pelo modelo (Coimbra *et al.*, 2002).

Deste modo quando se pretende prever uma só variável dependente, tem-se o modelo PLS1 e y é um vector, se várias variáveis dependentes forem previstas simultaneamente no mesmo modelo então Y é uma matriz e o método é denominado PLS2. Os métodos são muito semelhantes, a única modificação é que em vez de maximizar a covariância entre y e funções lineares de x , em PLS2 é necessário otimizar a covariância entre duas funções lineares, uma em x e uma em y . Para fins de interpretação, PLS2 pode ser vantajosa, mas para fins de previsão, geralmente é melhor PLS1, calibrando separadamente para cada variável y (Naes *et al.*, 2002).

Dependendo do objecto de estudo e de quais as quantificações que se pretende realizar, o número de amostras necessárias ao desenvolvimento PLS pode variar entre 20 a centenas de amostras. Quanto maior for a complexidade da amostra, maior o número de espectros que têm de ser analisados. (Conzen, 2006).

2.4.2 Pré-tratamento dos dados

Antes da etapa de construção dos modelos quimiométricos, frequentemente é necessário realizar uma etapa de pré-tratamento aos dados espectrais. Esta etapa tem como objetivo remover ou reduzir fontes de variação sistemática ou aleatória que não estejam relacionadas ao problema químico de interesse, bem como de realçar as características espectrais. Os pré-tratamentos a destacar são: o alisamento, a normalização, a correcção do Efeito do espalhamento Multiplicativo do Sinal e os cálculos da primeira e segunda derivada.

As variações nos dados espectrais podem ocorrer devido à instabilidade do instrumento, ao espalhamento da radiação durante a realização das medidas, ou ainda devido à variabilidade das propriedades físicas das amostras (Naes *et al.*, 2002).

Derivadas

A derivação não aumenta o conteúdo de informações, entretanto, ela individualiza melhor os constituintes pelo aumento do número de bandas de absorção, supressão das bandas largas, realce das bandas estreitas, além de melhorar a detectabilidade das pequenas características espectrais, como “*shoulders*” (Paschoal *et al.*, 2003). A derivação espectral aumenta a sensibilidade e selectividade quando comparada ao espectro de ordem zero. O aumento da selectividade deve-se a separação das bandas sobrepostas, enquanto o aumento da sensibilidade é devido à amplificação do sinal da derivada e a diminuição do ruído (Rocha e Teixeira, 2004).

A escolha da ordem de derivada depende das características do espectro original, dos constituintes da mistura e dos interferentes (Paschoal *et al.*, 2003). O aumento da ordem da derivada leva a uma maior resolução espectral, em contrapartida, diminui a sensibilidade e pode aumentar o nível de ruído. Alguma técnica de suavização, às vezes, é necessária juntamente com a derivação, pois o aumento da diferenciação do espectro degrada progressivamente a relação sinal/ruído do espectro (Rocha e Teixeira, 2004).

Suavização

A suavização tem como finalidade reduzir matematicamente ruídos aleatórios de alta frequência, o que resulta no aumento da relação sinal/ruído. Para esta finalidade existem diferentes filtros digitais, sendo os mais utilizados os filtro de média móvel e o filtro Savitzky-Golay.

O filtro de média móvel reduz o ruído proporcionalmente à largura do intervalo, no entanto distorce o sinal analítico de forma simultânea e proporcional. Assim sendo, a aplicação do filtro de média móvel fica reduzida a sinais de banda larga, em que a largura do intervalo necessário a redução do ruído não é crítica.

O filtro de Savitzky-Golay é menos sensível à largura do intervalo, possibilitando que este filtro seja aplicado a sinais analíticos com picos estreitos, apresentando resultados superiores aos obtidos com o filtro de média móvel. Entretanto, ainda se observa distorção do sinal à medida que o número de pontos utilizado no intervalo aumenta.

Os filtros de suavização mencionados acima atuam diretamente sobre o sinal analítico e não sobre as frequências que compõem o sinal. Esta característica torna os pouco seletivos, isto é, incapazes de diferenciar o que é sinal do que é ruído e, portanto, no processo de suavização de ruído uma parte da informação útil contida no sinal é simultaneamente removida. Já os filtros que atuam diretamente sobre as frequências que compõem o sinal, possibilitam a remoção do ruído de forma seletiva, sendo os filtros baseados em transformada de Fourier os mais populares (Cerqueira *et al.*, 2000)

Correção do efeito espalhamento multiplicativo (MSC)

O método da correção multiplicativa de sinal (*Multiplicative Scatter Correction* - MSC), é aplicado em espectros de amostras que possuem efeito de dispersão da luz, sendo muito aplicado em leituras de reflectância difusa. As amostras normalmente estão na forma de pó, agregados de grãos de diferentes tamanhos, pastas e soluções com partículas carregadas. Este método aplica-se sobretudo aos dados NIR, mas também é relevante para outros tipos de espectros; efeitos de dispersão em espectros de IR podem ser causados por efeitos de fundo, variação dos comprimentos de caminho óptico, temperatura e variações de pressão. Estes efeitos são, em geral, compostos tanto por efeitos multiplicativos (amplificação) como por efeitos aditivos.

Neste método cada espectro é corrigido de forma que todas as amostras tenham o mesmo nível de espalhamento de uma amostra de referência. Esta correção assume que o coeficiente de espalhamento é o mesmo para todos os comprimentos de onda (Esbensen, 2002).

Dados centrados na média

A centralização na média baseia-se na simples subtração da absorvância em cada comprimento de onda pela absorvância média a esse mesmo comprimento de onda para o conjunto das amostras. Assim, o novo valor de absorvância média para todas as amostras é igual a zero em cada comprimento de onda.

Do ponto de vista estatístico, a centralização tem como objectivo prevenir que os pontos mais distantes do centro dos dados tenham maior influência que os mais próximos, dando importância não à intensidade verificada mas sim à sua distância do valor médio. Esta operação geralmente diminui o número de factores do modelo (Kramer, 1998)

Normalização

A escala do espectro pode ser normalizada, removendo assim variações sistemáticas relativas às amostras. É realizada através da divisão de cada intensidade espectral pela raiz quadrada da soma dos quadrados de todas as intensidades do espectro correspondente (Naes *et al.* 2002; Esbensen, 2002).

3. Materiais e métodos

Na primeira parte deste capítulo, faz-se uma descrição das duas metodologias de referência aplicada: O fracionamento em fase reversa das frações FI, FII, e FIII dos vinhos, seguida de suas quantificações por reação colorimétrica, pelos métodos desenvolvidos por Sun et al. (1998a; 1998 b). A segunda metodologia desenvolvida por Sarneckis *et al.* (2006), onde efectua-se a subtração da absorvância a 280 do sobrenadante após a precipitação com MCP de uma amostra de referência.

Na segunda parte descreve as regiões espectrais utilizadas para o desenvolvimento dos modelos de calibração, bem como as condições de aquisição dos espectros e os métodos estatísticos aplicados.

3.1 Caracterização das amostras

A seleção da amostra teve por objetivo adquirir uma maior variabilidade de concentrações de taninos presentes nos vinhos tintos, deste modo optou-se por uma amostra heterogênea constituída por vinhos de diferentes idades ($n = 55$), produzidos entre os anos de 1969 ($n = 1$), 1971 ($n = 1$), 1976 ($n = 1$), 1999 ($n = 5$), 2000 ($n = 3$), 2001 ($n = 2$), 2002 ($n = 2$), 2004 ($n = 1$), 2005 ($n = 4$), 2006 ($n = 3$), 2007 ($n = 2$), 2008 ($n = 7$), 2009 ($n = 6$), 2010 ($n = 11$) e 2011 ($n = 6$);

Os vinhos foram produzidos a partir de uvas *Vitis vinífera*, sendo estas na sua maioria Trincadeira, Castelão, Cabernet Sauvignon, Syrah, Touriga Nacional, Alicante Bouschet e Aragonês. A concentração das frações FIII, FII e FI para os vinhos analisados compreendeu valores entre 98 - 2176; 4 - 487 e 3 - 48 mg/L epicatequina equivalente respetivamente e a concentração de taninos condensados totais variou entre 237 - 3213 mg/L de catequina equivalentes (valores no anexo 1).

Os dois métodos de referência aplicados apresentaram uma boa reprodutibilidade intralaboratorial. O método de precipitação com metil celulose possuiu um valor de desvio padrão médio laboratorial baixo, igual 98 mg/L catequina equivalente, o mesmo verificado para o método fracionamento seguido por quantificação com vanilina, onde os valores foram de 65 mg/L, 15 mg/L e 4 mg/L epicatequina equivalente para as frações FIII, FII e FI respetivamente.

3.2 Métodos de referência

3.2.1 Fracionamento das proantocianidinas por extração em fase sólida

Uma alíquota de 3 ou 5 mL da amostra foi desalcoolizada em um evaporador rotativo sob vácuo Rotavapor R-200 (temperatura $<30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Em seguida o pH foi ajustado a 7,0 com uma solução tampão de fosfato a pH 7,0 e uma solução de NaOH 0,1M. O cartucho C₁₈

Sep-Pak® Plus, foi previamente ativado, através de duas eluições com 10 mL de metanol, seguido de 10 mL de água destilada e 15 mL da solução tampão de fosfato a pH 7,0. O cartucho apresenta duas series distintas, a superior a tC₁₈ Sep-Pak e a inferior C₁₈ Sep-Pak.

A amostra desalcoholizada a pH 7,0 foi então introduzida no cartucho, onde ocorreu a absorção dos compostos fenólicos. Em seguida uma eluição com 10 mL da solução tampão de fosfato pH 7,0 diluída na proporção 1:8 em água destilada.

Eliminou-se os ácidos fenólicos e outros compostos indesejáveis com a solução tampão de fosfato. Em seguida, o cartucho foi seco em corrente de azoto.

Após a secagem do cartucho eluições foram efetuadas, primeiro com 25 mL de acetato de etila, onde eluiu as frações FI e FII, seguido de uma eluição com 10 mL de metanol para a eluição da fração FIII. Esta fração foi então evaporada, de forma a eliminar o eluente.

Para a separação das frações FI e FII, a amostra contendo estas frações foi então evaporada, em seguida dissolvida com 3 mL da solução tampão a pH 7,0 e introduzida no cartucho novamente. O cartucho foi previamente eluído com as soluções utilizadas na sua ativação.

O cartucho em seguida é seco novamente em corrente de azoto e após a secagem, a separação das frações é feita por eluição com 25 mL de éter etílico e com 10 mL de metanol, obtendo as frações FI e FII respectivamente. Estas foram então evaporadas nas mesmas condições descritas acima, para a eliminação do eluente.

O cartucho pôde ser reutilizado até quatro vezes, pela eluição com uma solução de HCl 1% (v/v) em metanol. O procedimento de fracionamento é representado abaixo (Figura 7)

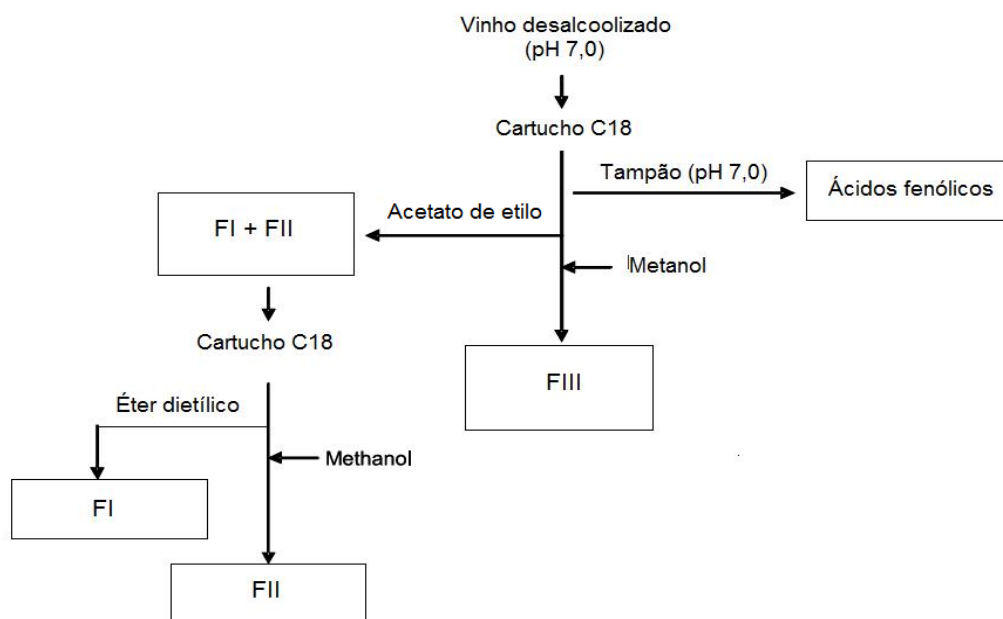


Figura 7 - Fracionamento dos vinhos tintos pelo método de Sun et al., (1998b).

3.2.1.2 Quantificação das frações FI, FII e FIII por reação com vanilina

Em um tubo de ensaio, adicionou-se 1,0 mL da amostra contendo uma das frações FI, FII ou FIII dissolvidas em metanol, 2,5 mL de solução de vanilina (concentração de 10 g/L em metanol) e por último 2,5 mL de uma solução 25% (v/v) de H₂SO₄ em metanol seguida da homogeneização da solução. Um ensaio em branco para cada fração foi obtido, pela substituição da adição da solução de vanilina por 2,5 mL de metanol.

Para a quantificação das frações FII ou FIII, a leitura da absorvância foi efetuada diretamente a 500nm a temperatura ambiente no espectrofotômetro Unican UV/Vis Spectrometer modelo UV4. A absorvância foi registrada após a verificação de sua estabilização. Na quantificação da fração FI, o registro da absorvância a 500 nm no espectrofotômetro é realizada após um tempo de reação de 15 min em banho-maria, com a temperatura fixada entre 25 e 30 °C.

Os resultados são expressos em mg/L de epicatequina, calculados a partir da curva de calibração desenvolvida para cada fração, desenvolvidas a partir da diluição com metanol de soluções de concentração conhecida. As curvas padrão para cada fração foram obtidas a partir de soluções de monômeros, oligômeros, e polímeros de 3-flavanóis, tendo R² superiores a 0,99 (Sun *et al.*, 1998a)

3.2.2 Quantificação dos taninos condensados totais por precipitação com metil celulose

Solução de sulfato de amônio saturada: em um balão contendo 300 mL de água deionizada, adicionou-se cristais de sulfato de amônia, agitando até obter cerca de 1,5 cm de cristais de sulfato de amônio depositados na parte inferior do balão.

Solução de metil celulose 0,04%: para um balão de 1L contendo 300 mL de água deionizada a 80 °C, foi adicionado 0,4g de metil-celulose (M-0387, Sigma-Aldrich®, 2% de viscosidade em solução aquosa a 20°C) e dissolvida rapidamente com um agitador magnético, evitando assim a formação de grandes aglomerados gelatinosos. Em seguida adicionou-se 700 mL de água deionizada a 0-5 °C e a agitou por 20-40 minutos imersa em água gelada (0-5 °C). Retirou-se então da água gelada e após a solução atingir a temperatura ambiente o volume final de 1 L foi completado com água desionizada.

Os procedimentos do método baseou-se na adição 3 mL de metil celulose 0,04 % (v/v) em 0,25 mL de vinho e agitou levemente diversas vezes, repousou a solução durante 2-3 min. Adicionou o volume de 2 mL de solução saturada de sulfato de amônio e o volume foi completado até 10 mL com água deionizada. A solução permaneceu em repouso durante 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugada por 5 minutos a 4.000 rpm. Uma solução

em branco, onde não houve a adição da solução de metil celulose, foi preparada para cada amostra a ser analisada.

Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para uma célula de quartzo e registrado a sua absorvância a 280 nm. A determinação da concentração de taninos condensados na amostra é obtida pela subtração das absorvâncias a 280 nm das duas: solução com a adição de metil celulose e solução sem adição de metil celulose.

$$A_{280} (\text{taninos condensados}) = A_{280} (\text{branco}) - A_{280} (\text{sobrenadante})$$

$$\text{Concentração de taninos (mg/L catequina eq.)} = \text{taninos}^a \times F^b$$

^b F(fator de diluição): 40

^ataninos (mg/L catequina): calculada a partir da curva de calibração catequina, obtida pela variação da concentração de 20 a 100 mg/L de catequina em água, seguida da leitura da absorvância a 280 nm, obtendo uma curva com R^2 superior a 0,99.

3.3 Aquisição espectral dos vinhos

Os espectros foram adquiridos em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) modelo AVATAR 360 da marca Nicolet® (Thermo Nicolet Corporation, Madison, WI), equipado com um detetor DTGS e divisor de feixe KBr.

A aquisição dos espectros foi efetuada em duas amostras de cada vinho e nenhum pré-tratamento foi realizado nos vinhos analisados. No mesmo dia da aquisição dos espectros, as amostras foram sujeitas as análises de referência, com o objetivo de evitar alterações químicas das amostras e de minimizar a introdução de erros nos dados. A absorvância de fundo (*Background*) das amostras foi corrigida utilizando o espectro de uma solução fornecida pelo fabricante do instrumento.

O software OMNIC da Thermo Nicolet foi utilizado para a aquisição dos espectros. Os dados foram registrados entre 3000 - 1000 cm^{-1} , a temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ com resolução espectral de 4 cm^{-1} e média de 32 varreduras (*scans*).

3.4 Desenvolvimento dos modelos de calibração

Embora toda a faixa espectral (3000 - 1000 cm^{-1}) tenha sido armazenada para cada amostra, no desenvolvimento dos modelos de calibração foram utilizadas somente quatro regiões espectrais: 1230 – 1320, 1450 – 1510, 1580 – 1615 e 1660 – 2000 cm^{-1} , baseadas nos estudos realizados por Fernández & Agosin, (2007).

Os picos entre 1000 – 1800 cm^{-1} , na zona de impressão digital, podem ser atribuídos às vibrações de estiramento C=C-C do anel aromático (regiões 1580 – 1615 e 1450 – 1510 cm^{-1}) e várias deformações angulares (região 1000 – 1225 cm^{-1}). Em particular, o pico por

volta de 1285 cm^{-1} (região $1230 - 1320\text{ cm}^{-1}$) é atribuído ao estiramento C – O do anel pirano presentes nos compostos flavonóides, (Fernández & Agosin, 2007).

No estudo realizado por estes autores a seleção das regiões espectrais para a determinação dos taninos condensados em extratos fenólicos de vinhos, foi executada através da incorporação de técnicas de seleção espectral automática à regressão linear por PLS, o que resultou em vários modelos de calibração, incluindo um modelo que contém as principais faixas espectrais observadas no espectro de infravermelho médio dos taninos condensados.

Modelos de calibração linear por regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foram desenvolvidos para a quantificação dos taninos condensados totais e para as frações FIII, FII e FI, utilizando os dados obtidos pelos métodos de referência.

O software Bacchus Acquisition foi utilizado na aquisição dos espectros. O processamento dos espectros foi efetuado pelo software Bacchus Quantification, que também desenvolveu as calibrações multivariada utilizando PLS. Ambos os softwares foram desenvolvidos pela CETIM®, França.

As amostras de vinho foram divididas em dois conjuntos: de calibração (75% das amostras) e de validação externa (25% das amostras), selecionadas de modo a cobrir toda a variação dos dados.

Antes do desenvolvimento da calibração, os outliers foram removidos do conjunto de calibração e vários pré-tratamentos (ponderação cm^{-1} , primeira e segunda derivada, média centrada e redução da variância) foram testados, selecionado o melhor modelo preditivo obtido, com base no maior coeficiente de determinação e maior desvio residual de predição, além da menor dispersão dos valores pela equação obtida para cada modelo.

O número ótimo de fatores PLS utilizado nos modelos PLS foi obtido pelo método de validação cruzada, com base na menor soma dos quadrados dos resíduos de predição (*prediction error sum of squares* - PRESS) e no valor de coeficiente de correlação (r), que deve ser o mais alto possível. A capacidade preditiva dos modelos foi testada utilizando o desvio residual de predição (RPD).

Um RPD relativamente pequeno indica que o modelo de calibração MIR não é robusto, em contraste valores relativamente altos de RPD indicam que os modelos têm uma elevada capacidade de predição da composição química do analito. Geralmente, um RPD maior que 3 é considerado aceitável para fins de predição da composição química em amostras que não foram utilizadas no conjunto de calibração.

4. Resultados e discussão

Uma vez que este estudo teve por objetivo a verificação da aplicabilidade da espectrometria FTIR, para a determinação dos taninos condensados e 3-flavanóis

monoméricos presentes nos vinhos, utilizou-se os resultados obtidos por dois métodos de referência (método de fracionamento em FI, FII e FIII seguido da quantificação pela reação com vanilina e o método MCP), para a verificação em questão. Esclarece-se no entanto, que não foi objeto deste estudo a comparação entre os dois métodos aplicados.

Considerando que o polímero de metil celulose não precipita 3-flavanóis monoméricos (Sarneckis et al., 2006). Os valores obtidos na quantificação dos taninos por precipitação com metil-celulose apresentaram-se muito superiores, aos valores obtidos pela soma das frações FII e FIII Observou-se também que há uma relação linear entre os mesmos ($R^2 = 0,57$; $n = 110$). Esta diferença pode ser evidenciada com um percentual duas vezes maior pelo método MCP em relação a soma das frações. Evidencia-se ainda que o percentual tende a aumentar conforme aumenta a idade dos vinhos (valores no anexo I).

A determinação da concentração de taninos condensados totais na amostra foi obtida pela subtração das absorvâncias a 280 nm de duas soluções, a saber: solução com a adição de metil celulose e solução sem adição de metil celulose.

Os elevados valores obtidos no presente estudo, resultaram da elevada precipitação dos compostos presentes nos vinhos analisados pela adição da solução de metil celulose, o que ocasionou uma diminuição da absorção. Isto pode ser um indício de que a precipitação com este polissacarídeo possuiu uma baixa especificidade, precipitando outros compostos que absorvem a 280 nm. Tem sido reportado na literatura que as proteínas complexam com polissacarídeos derivados da celulose, o que pode resultar na precipitação do complexo formado (Girard, Turgeon e Paquin, 2002; Koupantsis & Kiosseoglou, 2009).

Visto as proteínas absorverem a 280nm, possivelmente estas podem estar a precipitar com a solução de metil celulose. No entanto para a confirmação desta hipótese, é necessária a caracterização detalhada, nomeadamente do precipitado obtido pela precipitação com a solução de metil celulose ou a quantificação das proteínas presentes antes e após a adição da solução de metil celulose.

Na tentativa de compreender estas diferenças, foi realizada uma análise da composição e estrutura dos taninos quantificados pelos dois métodos, tendo por base a bibliografia existente.

No estudo de Sun *et al.* (1998a), verifica-se que a quantificação dos taninos condensados e 3-flavanóis por reação com vanilina não quantifica os taninos hidrolisáveis. Já com o método MCP Sarneckis et al. (2006), observou que os taninos enológicos de carvalho e quebracho foram precipitados por polimerização com metil celulose.

Neste estudo, observou-se que as diferenças entre os valores obtidos pelos dois métodos utilizados, não resultam somente da precipitação dos taninos hidrolisáveis, uma vez que os teores normalmente encontrados nos vinhos são muito inferiores aos dos taninos condensados.

Sarneckis et al. (2006) também evidenciou em seus estudos que os pigmentos poliméricos são completamente precipitados por solução de metil celulose.

Quanto às metodologias aplicadas verifica-se que as diferenças nos padrões (catequina pelo método MCP e monómeros, oligómeros, e polímeros de 3-flavanóis) utilizados para a calibração podem influenciar nos resultados, visto as diferentes absorvidades molares. Os diferentes métodos de quantificação utilizados (medição da absorvância a 280 nm pelo método MCP e método colorimétrico por reação com vanilina a 500 nm) podem também causar diferenças nos resultados. Para verificar estas diferenças é necessária uma caracterização em relação à composição das subunidades e da distribuição do tamanho da cadeia polimérica, do precipitado como também do sobrenadante que resultou da precipitação com metil celulose.

Embora haja vários estudos recentes que utilizem o método MCP e indiquem a necessidade do desenvolvimento de estudos para avaliar a influência da composição e estrutura dos taninos sobre o efeito da complexação e precipitação com metil-celulose, estes ainda não foram desenvolvidos (Kennedy *et al.*, 2006; Seddon & Downey, 2008; Mercurio & Smith, 2008; Harbertson & Downey, 2009)

Pelo verificado anteriormente, quer através de literatura, quer através dos resultados obtidos neste estudo, não foi possível encontrar as causas da diferença nos valores observados pela quantificação de taninos condensados por precipitação com metil celulose e pela soma das frações.

Características estruturais como o teor de ligações C₄-C₆ e C₄-C₈ das proantocianidinas, a proporção de catequina e epicatequina (Renard *et al.*, 2001), as diferenças nas substituições (Le Bourvellec *et al.* 2004), a proporção de procianidinas e prodelfinidinas (Le Bourvellec et al. 2004), o comprimento dos polímeros (Haslam, 1974; Renard *et al.*, 2001), as estruturas secundárias, como ramificação, ligações cruzadas e estruturas terciárias podem ter impacto sobre a cinética de ligação da metil celulose que resultariam em diferentes quantidades de taninos totais nas amostras sendo precipitada pelo método MCP.

4.1 Espectros

Os espectros dos vinhos foram deslocados ao longo do eixo da absorvância, para uma melhor visualização, o que não corresponde aos espectros originais. Estes apresentaram principais diferenças nas regiões entre 1000 – 1800 e 2800 – 3000 cm^{-1} , como observado na figura 8. As bandas entre 2800 – 3000 cm^{-1} com máximo de absorvância a 2892 cm^{-1} e 2904 cm^{-1} , correspondem as vibrações de estiramento O–H dos componentes maioritários do vinho, água e etanol. Na região entre 1000 – 1800 cm^{-1} , na zona de impressão digital, pode verificar duas bandas intensas entre 1000 – 1225 cm^{-1} com máximo de absorvância a 1045 e 1087 cm^{-1} podendo ser atribuídas as deformações C–H do anel aromático. A banda com máximo de absorvância em cerca de 1274 cm^{-1} é atribuído ao estiramento C–O do anel pirano presentes nos compostos flavonóides. A banda com máximo de absorvância a 1454 cm^{-1} corresponde às vibrações de estiramento C=C do anel aromático. As bandas entre 1310 e 1390 cm^{-1} podem ser atribuídas as deformações angulares C–O–H dos fenóis. A região entre 1700 e 2000 cm^{-1} estão associadas a combinações e *overtone*s dos compostos aromáticos (Fernández & Agosin, 2007).

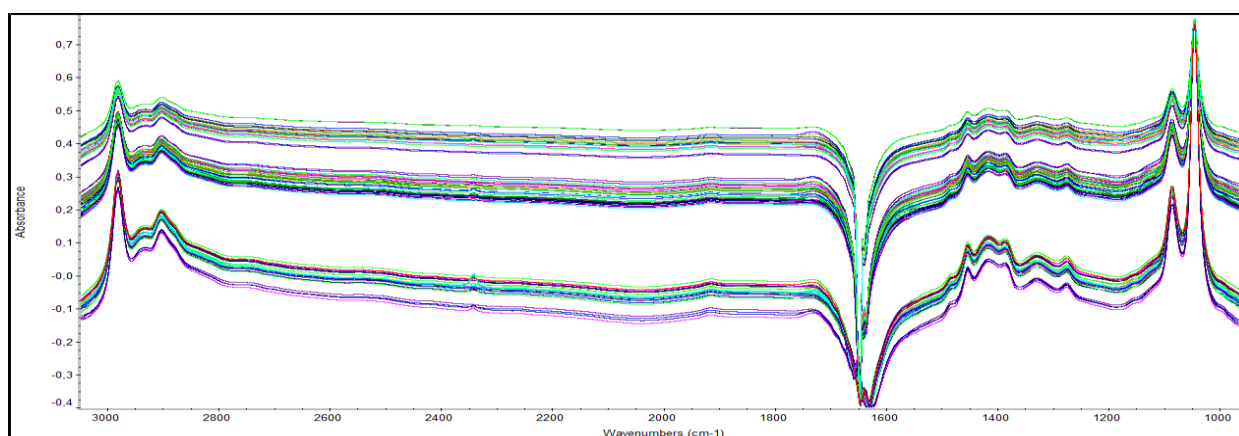


Figura 8 - Espectros dos vinhos tintos no FTIR (1000 – 3000 cm^{-1}).

4.2 Modelo para predição dos taninos condensados totais

Verificou-se que o melhor modelo preditivo para a quantificação de taninos condensados totais é o que resultou da aplicação da 1ª derivada e centralização na média dos dados, antes da construção do modelo de calibração linear. A figura 9 mostra o gráfico das concentrações de taninos condensados totais estimada por espectroscopia FTIR *versus* os valores de referência do modelo (método MCP), para o conjunto de calibração contendo 41 amostras em duplicata. Como se verifica na figura 9, o modelo possui um elevado coeficiente de determinação ($r^2 = 0,98$) para a quantificação dos taninos condensados totais. No entanto o número de fatores e o erro padrão de predição do modelo obtido pela

validação cruzada foram elevados ($SECV = 225 \text{ mg/L}$), o que indicou uma baixa capacidade preditiva por este modelo.

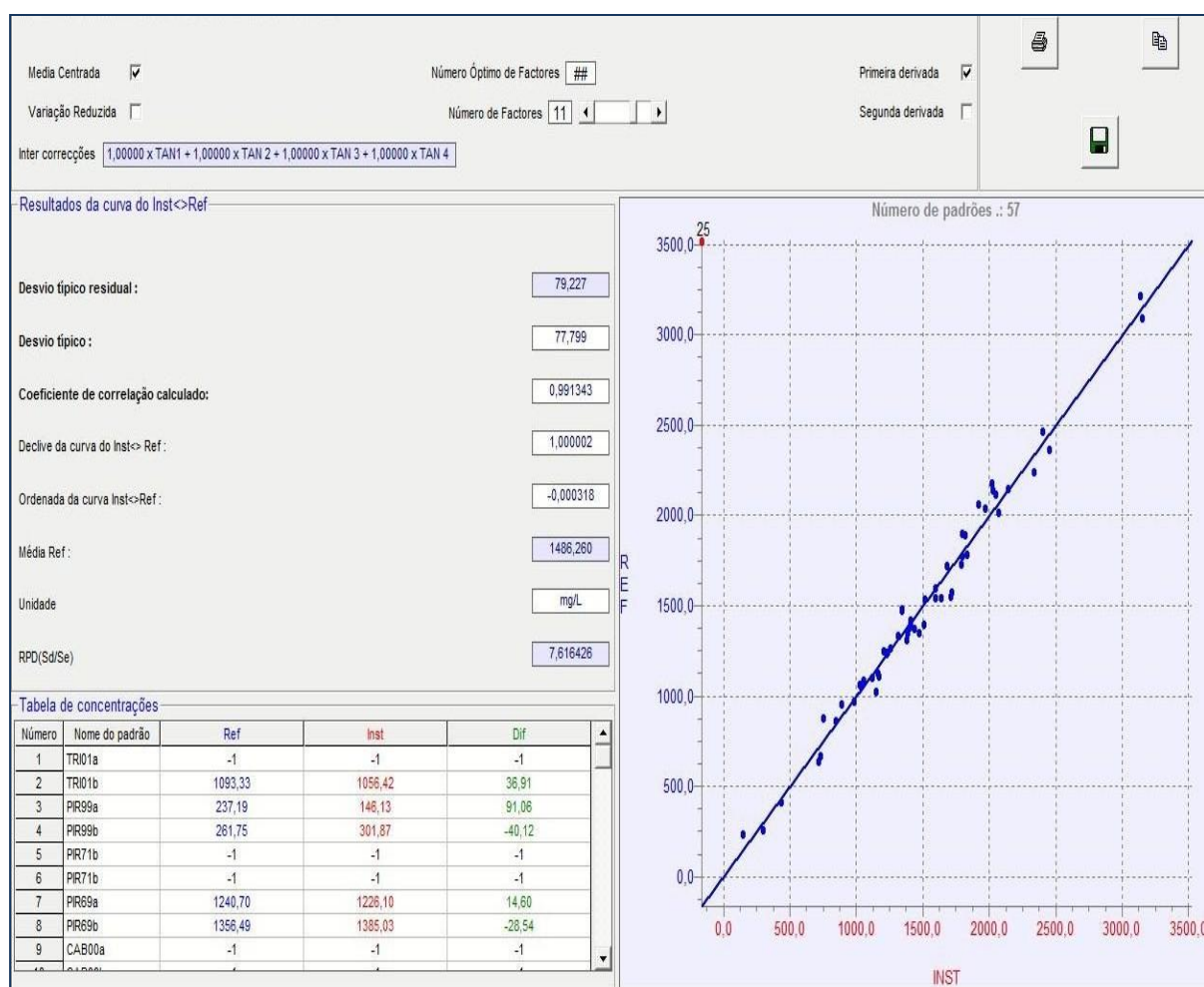


Figura 9 - Resultados e gráfico do modelo de quantificação dos taninos condensados totais (mg/L) previstas pelo modelo (INST) versus valores de referência (REF), para 41 amostras em duplicata.

Na validação externa do modelo utilizou-se 14 amostras em duplicata seleccionadas de modo a cobrir o intervalo de variação das concentrações de taninos condensados totais obtidas pelo método de referência. A Figura 10 mostra a correlação entre os valores de concentração de taninos condensados totais estimados pelo modelo *versus* os valores determinados pelo método de referência, após a exclusão de 3 amostras anómalas tendo valores duas vezes superiores aos desvios padrão dos resíduos. O coeficiente de determinação obtido na validação externa ($R^2 = 0,70$) foi inferior ao obtido pelo modelo de calibração, além de possuir um erro padrão de validação externa elevado ($SEP = 458 \text{ mg/L}$) e um baixo valor de $RPD = 1,40$, o que comprovou que o modelo não é suficientemente robusto.

No estudo Cozzolino *et al.* (2008) que também teve como objetivo o desenvolvimento de um modelo de predição utilizando o método de precipitação por metil celulose como referência, tendo 620 amostras de extratos de uva, o modelo resultante apresentou capacidade preditiva. O que indica-nos que o reduzido nº de amostras no nosso estudo possivelmente, dever ter sido o principal fator que contribui para este resultado e para os apresentados em seguida.

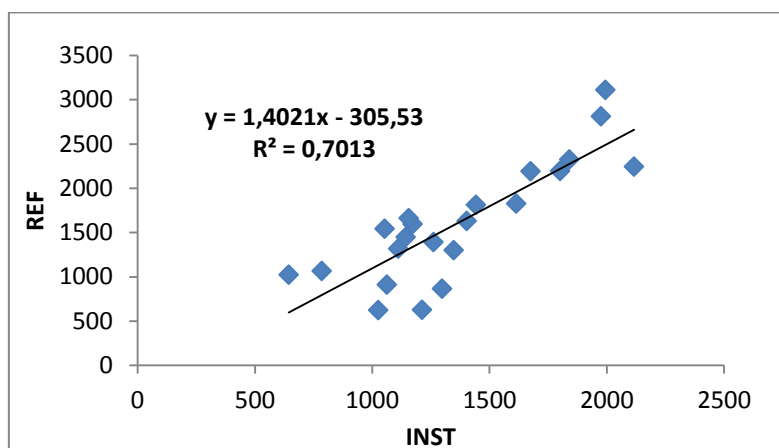


Figura 10 - Validação externa: Relação entre os valores preditos pelo modelo de calibração linear e os valores de taninos condensados totais (mg/L) obtidos pelo método de referência, para o conjunto de 11 amostras em duplicata.

4.3 Modelo para predição dos 3-flavanóis monoméricos (FI)

Observou-se que o melhor modelo de regressão linear construído para a quantificação dos 3-flavanóis é o que possui como pré-tratamento a centralização na média e 2ª derivada. Este modelo apresentou uma elevada capacidade de estimação dos 3-flavanóis ($r^2 = 0,98$) e um erro padrão de validação para calibração aceitável pela validação cruzada (SECV= 4 mg/L). O gráfico resultante do modelo de calibração e os respectivos resultados estatísticos do modelo de calibração linear encontram-se na Figura 11.

Na validação externa deste modelo e dos demais desenvolvidos para a predição das frações FII e FIII, utilizou-se 11 amostras em duplicata seleccionadas de modo a cobrir o intervalo de variação das concentrações dos 3-flavanóis monoméricos, proantocianidinas oligoméricas e poliméricas. Na validação externa, embora o valor de SEP = 5, tenha sido próximo do obtido na validação externa, o coeficiente de determinação da validação externa ($R^2 = 0,53$) foi muito inferior ao da validação cruzada do modelo (Figura 12), além do valor de RPD = 1,35 estar muito abaixo dos valores aceitáveis, o que confirmou que este modelo não apresenta capacidade quantitativa. Este resultado já era esperado considerando os baixos teores de 3-flavanóis presentes nos vinhos analisados (3 - 48 mg/L) e a sensibilidade requerida pelo instrumento.

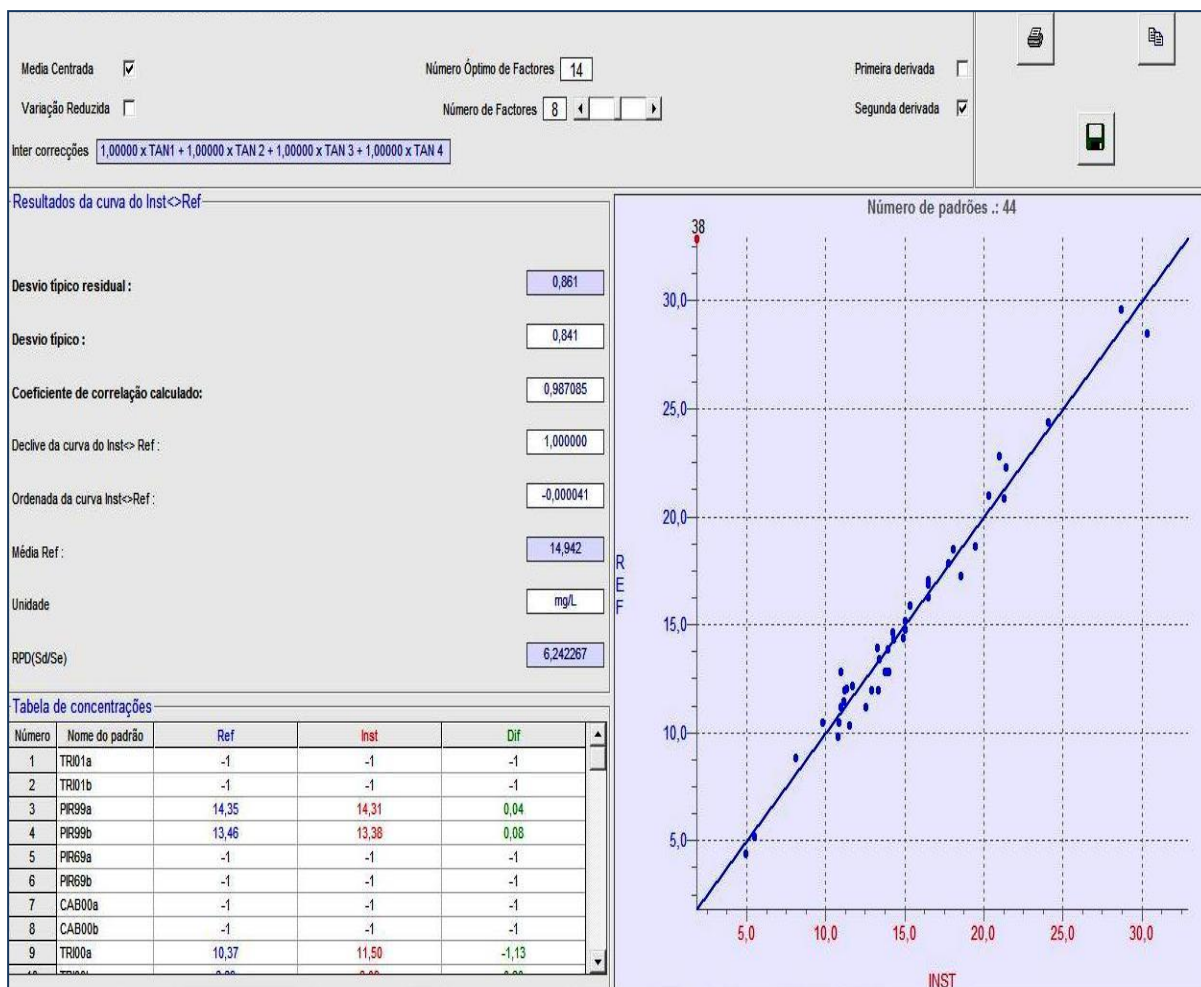


Figura 11 - Resultados e gráfico do modelo de quantificação dos 3-flavanóis monoméricos (mg/L) previstas pelo modelo (INST) versus valores de referência (REF), para 41 amostras em duplicata.

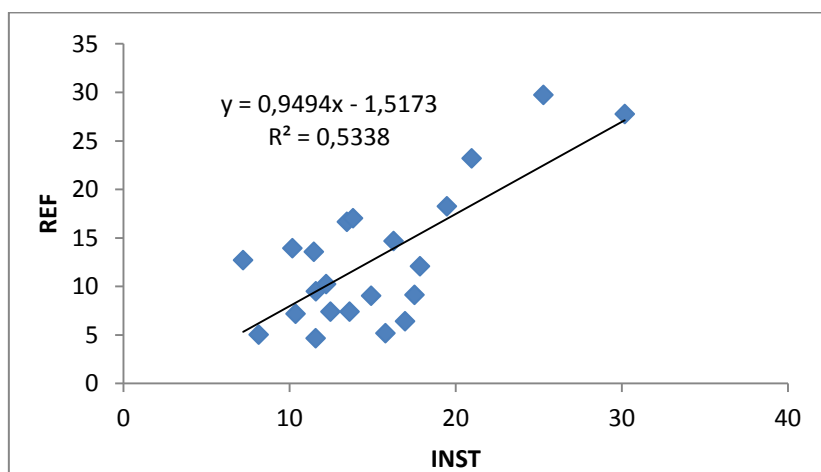


Figura 12 - Validação externa: Relação entre os valores preditos pelo modelo de calibração linear e os valores de 3-flavanóis (mg/L) obtidos pelo método de referência, para o conjunto de 11 amostras em duplicata.

4.4 Modelo para predição dos taninos condensados oligoméricos (FII)

Para a quantificação dos taninos oligoméricos, o modelo de calibração resultante da aplicação da 2ª derivada e centralização na média dos dados mostrou elevada capacidade preditiva ($r^2 = 0,99$) e um erro padrão de validação cruzada razoável (SECV = 19 mg/L), como indicados na Figura 13.

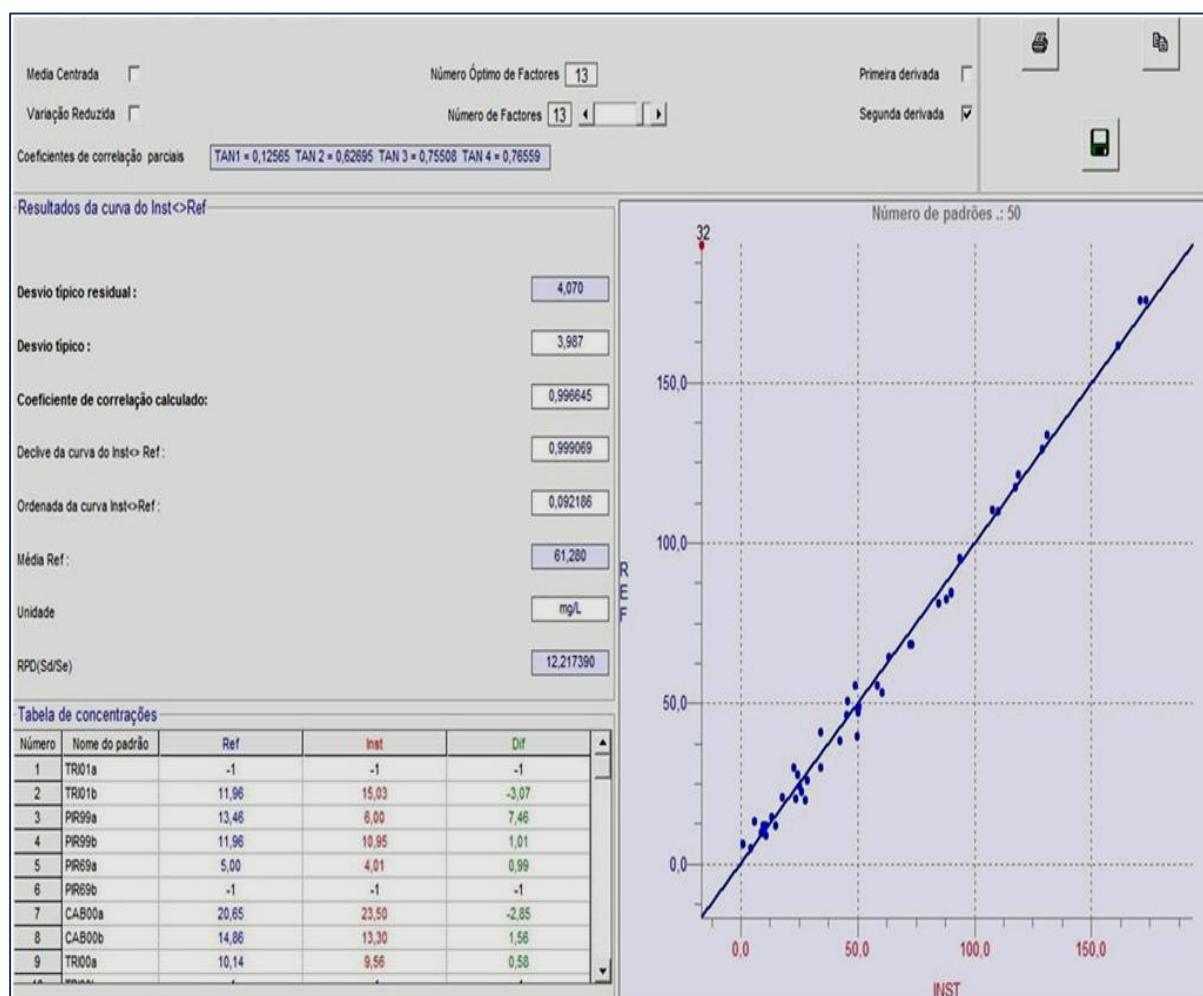


Figura 13 - Resultados e gráfico do modelo de quantificação dos taninos oligoméricos (mg/L) previstas pelo modelo (INST) versus valores de referência (REF), para 41 amostras em duplicata.

A validação externa deste modelo de calibração linear para a quantificação dos taninos oligoméricos mostrou uma baixa correlação ($R^2 = 0,47$), como demonstrado na figura 14. O valor de SEP = 44 foi praticamente o dobro do obtido na validação externa e o baixo valor de RPD = 1,37 confirmaram que este modelo não apresenta capacidade preditiva.

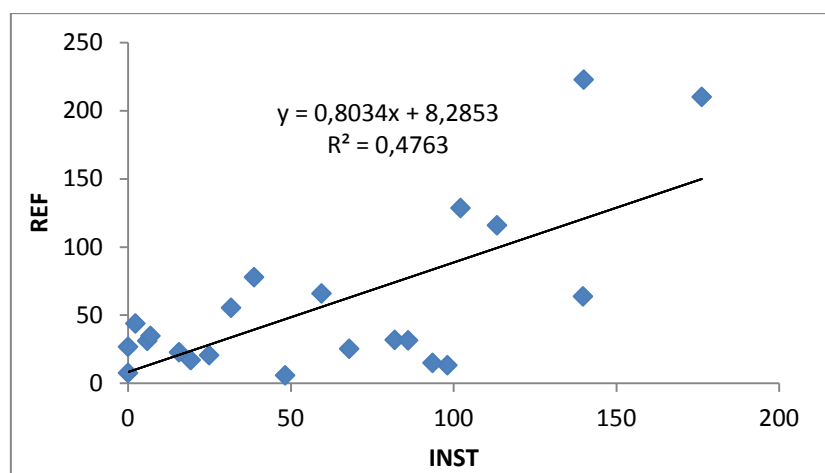


Figura 14 - Validação externa: Relação entre os valores preditos pelo modelo de calibração linear e os valores de taninos oligoméricos (mg/L) obtidos pelo método de referência, para o conjunto de 11 amostras em duplicata.

4.5 Modelo para predição dos taninos condensados poliméricos (FIII)

Os teores de taninos condensados poliméricos presentes nos vinhos analisados, apresentaram uma elevada amplitude de valores (100 – 2176 mg) quando utilizado o método de referência por fracionamento. Ao desenvolver modelos de calibrações utilizando esta faixa de valores observou-se que no modelo onde os taninos condensados poliméricos encontravam-se em concentrações inferiores a 400 mg/L, obtidas pelo método de referência, a tendência foi de sobrestimar estes valores. Contudo em concentrações superiores a 400 mg/L os taninos condensados poliméricos foram subestimados pelo modelo. Assim, optou-se pela construção de dois modelos de calibração, um para concentrações inferiores a 400 mg/L e outro para superiores a esta.

O melhor modelo preditivo para a quantificação de taninos condensados em ambas as faixas de concentração é o que resultou da aplicação da 1ª derivada e centralização na média dos dados. Os dois modelos possuíram uma elevada capacidade preditiva ($r^2 = 0,99$) para a determinação dos taninos condensados poliméricos (figura 15 e 16). O valor do erro padrão de calibração da validação cruzada no modelo desenvolvido para concentrações inferiores a 400 mg/L foi aceitável (SECV = 48 mg/L), no entanto no modelo com concentrações superiores a 400 mg/L foi muito elevado (SECV = 512 mg/L).

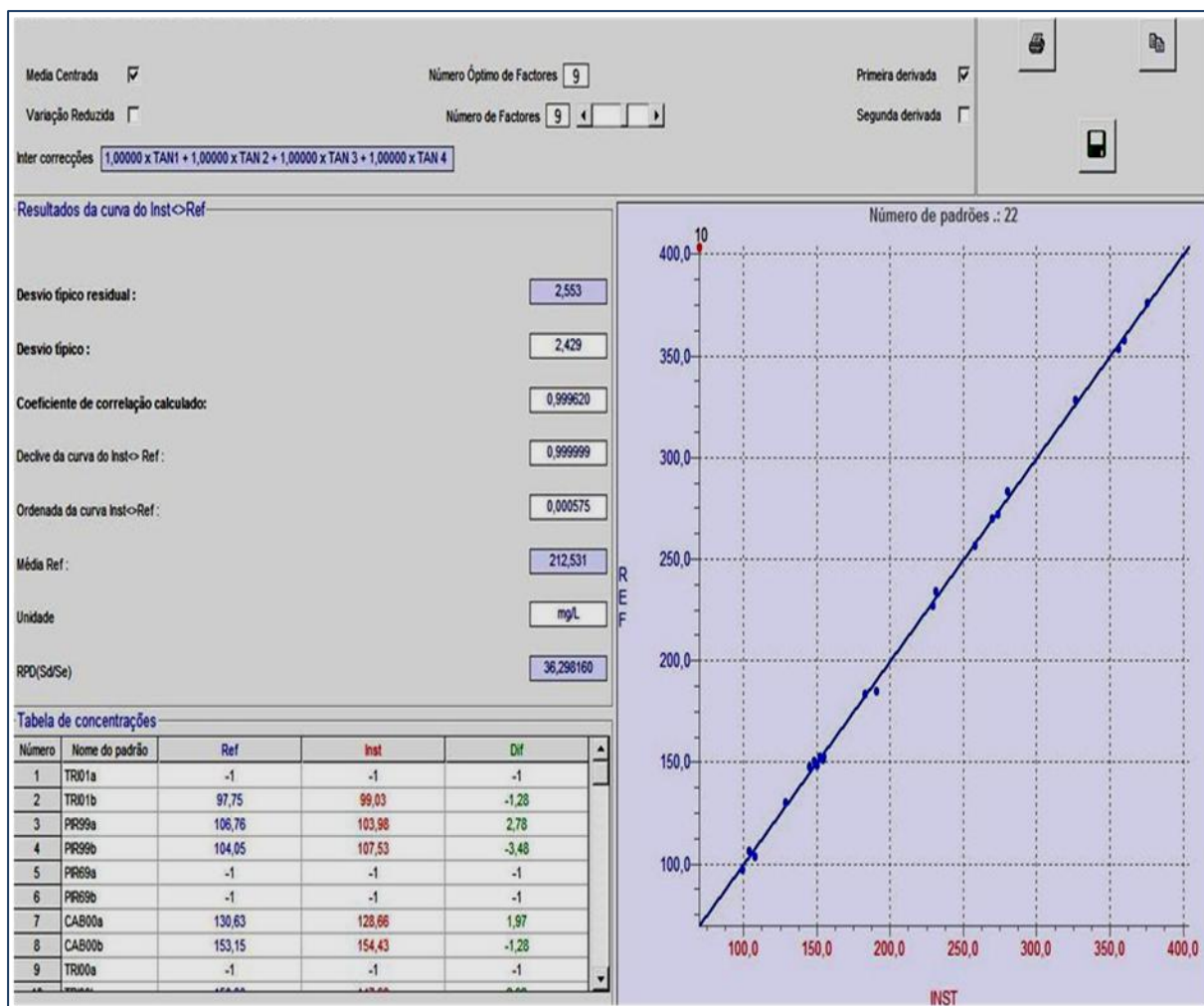


Figura 15 - Resultados e gráfico do modelo de quantificação dos taninos poliméricos com concentrações inferiores a 400 mg/L (mg/L) previstas pelo modelo (INST) versus valores de referência (REF), para 41 amostras em duplicata.

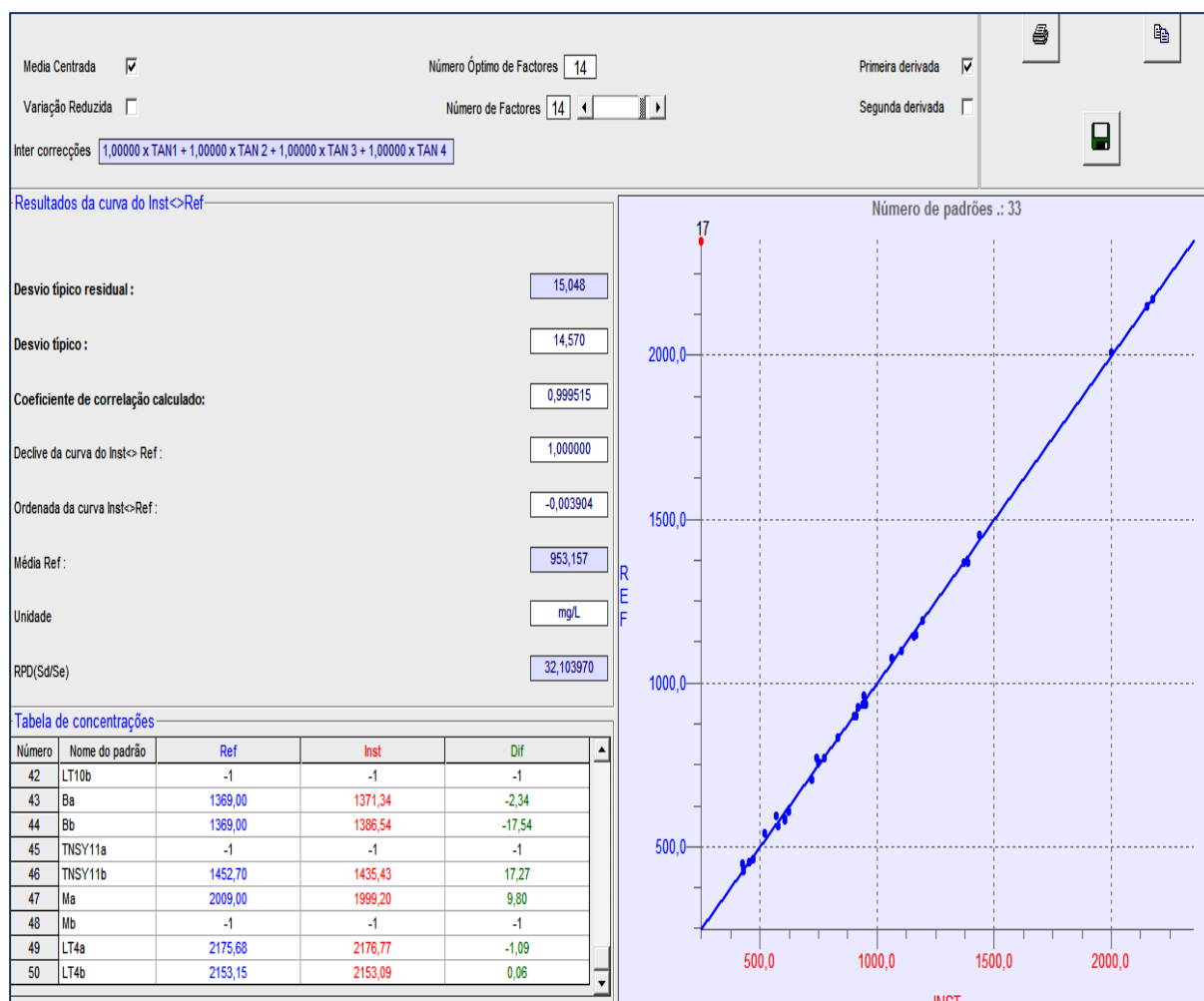


Figura 16 - Resultados e gráfico do modelo de quantificação dos taninos poliméricos com concentrações superiores a 400 mg/L (mg/L) previstas pelo modelo (INST) versus valores de referência (REF), para 41 amostras em duplicata.

O conjunto de 11 amostras seleccionadas anteriormente para a validação externa dos modelos obtidos para a quantificação da fração FI e FII foram divididos de modo a cobrir o intervalo de variação das concentrações de taninos condensados poliméricos (FIII). Deste modo o conjunto foi dividido em 6 e 5 amostras para a realização da validação externa do modelo de concentrações inferiores e superiores a 400 mg/L respectivamente. Sendo que estas divisões comprometeram o desenvolvimento dos modelos e suas posteriores validações, pelo fato de não ter amostras suficientemente capazes de formar dois grupos expressivos.

A validação externa do modelo para concentrações inferiores a 400 mg/L mostrou que este não apresentou capacidade preditiva, uma vez que teve um baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,64$), além de um erro padrão de validação externa (SEP = 91 mg/L) superior ao da validação cruzada, e um baixo valor de RPD = 1,40, ao contrário do modelo para concentrações superiores a 400 mg/L, que mostrou um elevado coeficiente de

determinação ($R^2 = 0,83$) como demonstrados na figura 17 e 18. O erro padrão de validação externa foi inferior ao da validação externa (SEP = 130 mg/L) e o valor de RPD = 2,40 foi quase aceitável. No entanto, uma vez que o modelo de calibração para concentrações superiores a 400 mg/L apresentou um elevado erro padrão de calibração obtido na validação cruzada e considerando o baixo número de amostras utilizadas na validação externa, não podemos afirmar que este modelo seja suficientemente robusto.

Situação semelhante foi encontrada no estudo de Almeida, (2009), no qual as amostras analisadas de farinha possuíam elevadas amplitudes de concentração resultando em erros de previsão elevados obtidos pelos modelos de calibração para a predição da humidade, matéria gorda e proteína. Com o objetivo de melhorar a capacidade preditiva destes modelos optou-se por separar as amostras em grupos de amostras mais semelhantes entre si. Contudo esta separação resultou em modelos de calibração pouco robustos, para além de que as validações externas se tornaram complicadas devido ao reduzido número de amostras.

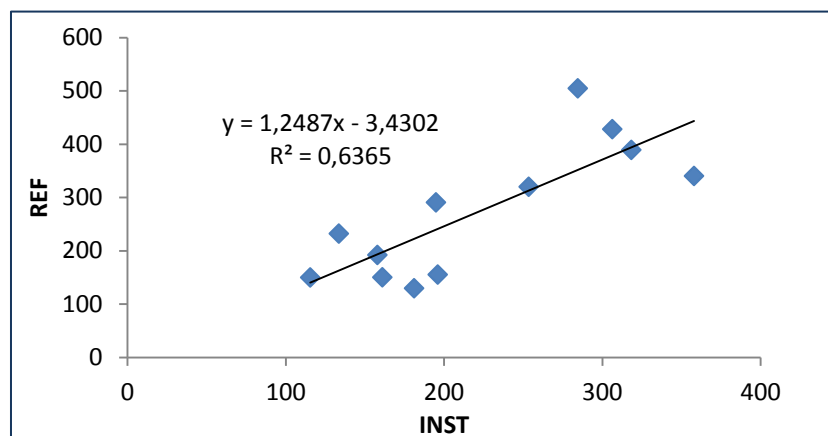


Figura 17 - Validação externa: Relação entre os valores preditos pelo modelo de calibração linear e os valores de taninos poliméricos com concentrações inferiores a 400 mg/L obtidos pelo método de referência, para o conjunto de 6 amostras em duplicata.

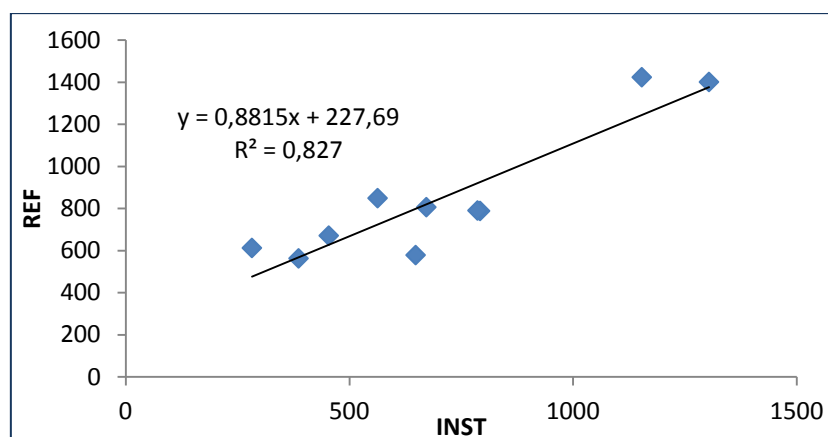


Figura 18 – Validação externa: Relação entre os valores preditos pelo modelo de calibração linear e os valores de taninos poliméricos com concentrações superiores a 400 mg/L obtidos pelo método de referência, para o conjunto de 6 amostras em duplicata.

Os cinco modelos de calibração lineares desenvolvidos neste estudo apresentaram uma elevada correlação, entre os valores preditos pelo modelo e os valores obtidos pelos dois métodos de referência utilizados, apresentando coeficientes de determinação por validação cruzada elevados, próximos de um, embora o número de fatores utilizados foram normalmente muito elevados. No entanto ao efetuar a validação externa aos mesmos modelos, utilizando amostras que não pertenciam ao conjunto de calibração, observou-se que os valores dos coeficientes de determinação foram muito inferiores aos obtidos por validação cruzada, excepto para o modelo de predição dos taninos poliméricos com concentrações superiores a 400 mg/L, no entanto não foi possível aceitar este modelo como já discutido anteriormente.

Deste modo os cinco modelos apresentaram uma baixa capacidade preditiva para a quantificação dos taninos condensados totais, 3-flavanóis monoméricos (FI), taninos condensados oligoméricos (FII) e taninos condensados poliméricos com concentrações inferiores e superiores a 400 mg/L (FIII).

O tamanho, variabilidade e complexidade das amostras, bem como as regiões espectrais do infravermelho médio empregadas no desenvolvimento dos modelos em questão, são fatores determinantes para a obtenção de modelos de calibração robustos.

A alta heterogeneidade das castas e idades dos vinhos empregados neste estudo e principalmente o número de amostras relativamente pequeno, podem ter contribuído para a baixa capacidade preditiva dos modelos desenvolvidos.

Considerando a elevada natureza heterogênea da matriz dos vinhos tintos, a caracterização dos compostos fenólicos no infravermelho médio, apresenta duas principais limitações devido a dominância das bandas de absorção dos principais componentes do vinho, particularmente a água e etanol, além de similares bandas de absorção de outros

componentes do vinho, como água, etanol e ácidos orgânicos, como citado anteriormente. A presença destes interferentes na matriz das amostras pode ter contribuído para a obtenção de modelos pouco fidedignos.

Outro fator que também pode ter contribuído para estes resultados foi a seleção das regiões espectrais baseada nas características espectrais dos taninos condensados. Fernández & Agosin (2007) obtiveram melhores resultados utilizando a faixa espectral completa de 650 a 4000 cm^{-1} . Contudo no presente estudo a utilização da faixa espectral completa, apresentou falta de correlação nos modelos obtidos. Esta diferença pode ser pelo fato de estarmos utilizando o vinho sem qualquer pré-tratamento enquanto no estudo de Fernández & Agosin (2007), as amostras consistiam de extratos fenólicos de vinhos. Como verificado na literatura citada no presente estudo, não se verifica um consenso relativamente as regiões espectrais ótimas para a quantificação dos taninos, pelo que as regiões espectrais utilizadas neste estudo podem ter contribuído para os resultados obtidos.

Em estudo desenvolvido por Patz et al. (2004), evidenciou-se que a espectroscopia por FTIR no infravermelho médio não é muito eficaz para a quantificação de componentes minoritários com teores inferior a 200 mg/L. No entanto Schneider et al. (2004), obteve modelos de calibração com elevada capacidade preditiva ($r = 0,94$ e $0,90$ e concentração média de 182 e 311 $\mu\text{g/L}$ de C13 norisoprenóides e monoterpênicos, respectivamente), para a determinação dos precursores de aroma em uvas, quando primeiramente efectuou uma pré-purificação com uma resina PVPP antes da extração por fase sólida.

5. Conclusão

A aplicação da espectroscopia no infravermelho médio por transformada de Fourier, para a determinação dos taninos da uva apresentou algumas vantagens sobre os outros métodos de referência aplicados neste estudo, sobretudo sobre o método de fracionamento e quantificação desenvolvido por Sun *et al.* (1998a,b).

O tempo de análise e o baixo custo requerido por esta técnica, além de eliminar os erros associados ao operador (uma vez que a preparação da amostra é mínima), justificam a continuação de estudos no desenvolvimento de modelos de calibração suficientemente robustos para a determinação dos compostos fenólicos quantificados no presente trabalho, permitindo que se obtenha um elevado número de resultados num curto período de tempo e um maior conhecimento sobre a estrutura e composição dos taninos condensados presentes nos vinhos tintos.

Os cinco modelos desenvolvidos neste estudo não foram suficientemente robustos para a predição dos valores de taninos condensados totais, 3-flavanóis monoméricos (FI), taninos oligoméricos (FII) e taninos condensados poliméricos com concentrações inferiores e superiores a 400 mg/L (FIII). Este resultado deve-se sobretudo ao número insuficiente de amostras para o desenvolvimento dos modelos, devido à morosidade e complexidade dos métodos de referência, tanto para o desenvolvimento dos modelos de calibração como para as suas respectivas validações externas.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, é sugerido para estudos futuros, a caracterização detalhada, nomeadamente do precipitado obtido pela precipitação com a solução de metil celulose e o aumento do número de amostras analisadas com a finalidade de obter modelos de calibração mais robustos para a predição dos taninos da uva.

Além das questões investigadas diretamente neste estudo, ao longo do trabalho outras foram surgindo e poderão caracterizar-se como objeto de investigação de futuros estudos:

- 1) Efetuar uma caracterização detalhada, nomeadamente do precipitado obtido pela precipitação com a solução de metil celulose.
- 2) Verificar se aumento do número de amostras utilizadas no desenvolvimento dos modelos de calibração resulta em modelos com capacidade preditiva para a determinação dos taninos da uva.

6. Bibliografia

Adams, D. O., e Harbertson, J. F. (1999). Use of alkaline phosphatase for the analysis of tannins in grapes and red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* , 50, 247–252.

Almeida, F.M.N. (2009). *Espectroscopia de Infravermelho Próximo com Transformada de Fourier (FT-NIR) na Caracterização de Farinhas para Alimentação Pueril*. Dissertação de mestrado. Instituto Superior técnico - UTL, Lisboa.

Bertrand, D., e Dufour, E. (2000). *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Paris, França: Tec & Doc.

Boulet, J. C., Williams, P., e Doco, T. (2007). A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* , 69, 79-85.

Bourzeix, M., Weyland, D., e Heredia, N. (1986). Etude des catéches et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne. *Bull O.I.V* , 59, 1171-1254.

Broadhurst, R. B., e Jones, W. T. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J. Sci. Food Agric.* , 29, 788-794.

Cabrita, M. J., Ricardo da Silva, J. M., e Laureano, O. (2003). Os Compostos Polifenólicos das Uvas e dos Vinhos. *Actas do I Seminário Internacional de Vitivinicultura* (pp. 61 -102). Lisboa: www.isa.utl.pt/riav/publicacoes.

Cerqueira, E., Poppi, R., Kubota, L., e Mello, C. (2000). Utilização de filtro de transformada de fourier para a minimização de ruídos em sinais analíticos. *Química Nova* , 23, 690-698.

Cheyrier, V. (2006). Flavonoids in Wine. In O. M. Andersen, e K. R. Markham, *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. New York: Taylor & Francis Group.

Cheyrier, V., e Fulcrand., H. (2003). Analysis of polymeric proanthocyanidins and complex polyphenols. In C. Santos-Buelga, & G. Williamson, *Methods in Polyphenol Analysis* (pp. 284-313). Cambridge: R. Soc. Chem.

Coimbra, M. A., Gonçalves, F., Barros, A., e Delgadillo, I. (2002). FT-IR spectroscopy and chemometric analysis of white wine polysaccharide extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3405–3411

Coimbra, A. C., Barros, A. S., Coelho, E., Gonçalves, F., Rocha, M. S., e Delgadillo, I. (2005). Quantification of polymeric mannose in wine extracts by FT-IR spectroscopy and OSC-PLS1 regression. *Carbohydrate Polymers* , 61, 434–440.

Conzen, J. P. (2006). *A Practical Guide for the Method Development in the Analytical Chemistry*. Bruker Optick GmbH.

Cozzolino, D., Kwiatkowski, M., Parker, M., Cynkar, W., Dambergs, R. e Gishen, M. (2004). Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* , 513, 73–80.

de Freitas, V., e Mateus, N. (2001). Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during Port wine aging. *Journal of agricultural and food chemistry* , 49, 5217-22.

Dimitrios, S. (2010). *Assimilable nitrogen of wine grapes. Validations and comparison of formol and FTIR method*. Dissertação de mestrado. Instituto Superior Técnico de Lisboa – UTL, Lisboa.

Dixit, V., Tewari, J. C., Cho, B., e Irudayaraj, J. M. (2005). Identification and quantification of industrial grade glycerol adulteration in red wine with fourier transform infrared spectroscopy using chemometrics and artificial neural networks. *Applied Spectroscopy* , 59, 1553-1561.

Dubernet, M., e Dubernet, M. (2000). Utilisation de l'analyse infrarouge à transformée de Fourier pour l'analyse oenologique de routine. *Rev. Fr. OEnol.* , 181, 10-13.

Dubernet, M., Dubernet, M., Grasset, F., e Garcia, A. (2001). Analyse de l'azote assimilable dans les moûts par Interférométrie Infrarouge à Transformée de Fourier. *Revue Française d'OEnologie* , 187, 9-13.

Edelmann, A., Diewok, J., Schuster, K. C., e Lendl, B. (2001). Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *J. Agric. Food Chem.* , 49, 1139-1145.

Esbensen, K. H. (2002). *Multivariate Data Analysis in Practice: An Introduction to Multivariate Data Analysis and Experimental Design*. Oslo, Norway: CAMO Process AS.

Fernández, K., e Agosin, E. (2007). Quantitative Analysis of Red Wine Tannins Using Fourier-Transform Mid-Infrared Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* , 55, 7294-7300.

Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J., e Escribano-Bailón, M. (2011). Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy. *Food Science and Technology* , 44, 847-853.

Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J., Rivas-Gonzalo, J., e Escribano-Bailón, M. (2010). Feasibility study on the use of near infrared spectroscopy to determine flavanols in grape seeds. *Talanta* , 82, 1778-1783.

Fournand, D., Vicens, A., Sidhoum, L., Souquet, J., Moutounet, M., e Cheynier, V. (2006). Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 54, 7331–7338.

Fu, Y., Lim, L. T., e McNicholas. (2009). Changes on Enological Parameters of White Wine Packaged in Bag-in-Box during Secondary Shelf Life. *Journal of food science* , 74, nº 8.

Fukuchi, K., Sakagami, H., Okuda, T., e Hatano, T. (1989). Inhibition of herpes simplex virus infection by tannins and related compounds. *Antiviral Res.* , 11, 285-297.

Fulcrand, H., Remy, S., Souquet, J., Cheynier, V., e Moutounet, M. (1999). Study of Wine Tannin Oligomers by On-Line Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* , 47, 1023-1028.

Fuleki, T., e Ricardo da Silva, J. M. (1997). Catechin and Procyanidin Composition of Seeds from Grape Cultivars Grown in Ontario. *J. Agric. Food Chem.* , 45, 1156-1160.

Gallignani, M., Ayala, C., Brunetto, M. R., Burguera, J. L., e Burguera, M. (2005). A simple strategy for determining ethanol in all types of alcoholic beverages based on its on-line liquid–liquid extraction with chloroform, using a flow injection system and Fourier transform infrared spectrometric detection in the mid-IR. *Talanta* , 68, 470–479.

Girard, M., Turgeon, S., e Paquin, P. (2002). Emulsifying Properties of Whey Protein-Carboxymethylcellulose Complexes. *Journal of food science* , 67, 113-119.

Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges, 2eme partie. Mesure, origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne ed du Vin* , 18, 253–271.

Gyamfi, M. A., e Aniya, Y. (2002). Antioxidant properties of Thonningianin A, isolated from the African medicinal herb, Thonningia sanguinea. *Biochem. Pharmacol.* , 63, 1725 –1737.

Hagerman, A., e Butler, L. (1978). Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 26, 809–812.

Hagerman, A.E. (2002). *Tannin Handbook*. Miami University, Oxford. Obtido 10 de 2011: <http://chemistry.muohio.edu/hagerman>

Hapiot, P., Neudeck, A., Pinson, J., Fulcrand, H., Neta, P., e Rolando, C. (1996). Oxidation of caffeic acid and related hydroxycinnamic acids. *J. Electroanal. Chem.* , 405, 169-176.

Harbertson, J. F., e Downey, M. O. (2009). Investigating differences in tannin levels determined by methylcellulose and protein precipitation. *Am. J. Enol. Vitic.* , 60, 246-249.

Harbertson, J., Picciotto, E. A., e Adams, D. O. (2003). Measurement of polymeric pigments in grape berry extracts and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching. *American Journal of Enology and Viticulture* , 54, 301–306.

Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *J. Nat. Prod.* , 59, 205–215.

Haslam, E. (1974). Polyphenol-protein interactions. *Biochemical Journal* , 139, 285–288.

Haslan, E. (1980). In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* , 19, 2577-2582.

Helfer, G., Ferrão, M., Ferreira, C., e Hermes, N. (2006). Pulicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* , 26(4), 779-786.

Herderich, M. J., e Smith, P. A. (2005). Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 11, 205–214.

Ittah, Y. (1991). Titration of tannin via alkaline-phosphatase activity. *Analytical Biochemistry* , 192, 277–280.

Jensen, J. S., Egebo, M., e Meyer, A. S. (2008). Identification of Spectral Regions for the Quantification of Red Wine Tannins with Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* , 56, 3493–3499.

Jerez, M., Tourino, S., Sineiro, J., Torres, J. L., e Nunez, M. J. (2007). Procyanidins from pine bark: Relationships between structure, composition and antiradical activity. *Food Chem.* , 104, 518 –527.

Kennedy, J. A., Ferrier, J., Harbertson, J. F., e Gachons, C. P. (2006). Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *Am. J. Enol. Vitic.* , 57, 481–485.

Khandpur, R. S. (2007). *Handbook of Analytical instruments*. New York: McGraw-Hill Companies Inc.

Koupantsis, T., e Kiosseoglou, V. (2009). Whey protein–carboxymethylcellulose interaction in solution and in oil-in-water emulsion systems. Effect on emulsion stability. *Food Hydrocolloids* , 23, 1156–1163.

Kramer, R. (1998). *Chemometric techniques for quantitative analysis*. New: Marcel Dekker, Inc.

Labarbe, B., Cheynier, V., Broussaud, F., Souquet, J., e Moutounet, M. (1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.* , 47, 2719-2723.

Laboratório de Plasmas Tecnológicos. UNESP. *Espectroscopia de absorção no infravermelho*. Obtido em 09 de 2011: <http://www.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm>

Lamuela-Raventós, R. M., e Waterhouse, A. L. (1994). A Direct HPLC Separation of Wine Phenolics. *American Journal of Enology and Viticulture* , 45, 1-5.

Lazarus, S. A., Adamson, G. E., Hammerstone, J. F., e Schmitz, H. H. (1999). High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Proanthocyanidins in Foods and Beverages. *J. Agric. Food Chem.* , 47, 3693-3701.

Le Bourvellec, C., Guyot, S., e Renard, C. (2004). Noncovalent interaction between procyanidins and apple cell wall material Part I. Effect of some environmental parameters. *Biochimica et Biophysica Acta* , 1672, 192–202.

Lea, A., Bridle, P., Timberlake, C. F., e Singleton, V. L. (1979). The procyanidins of white grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture* , 30, 289-300.

Massart, D. L., Vandeginste, B., Buydens, L., Jong, S., Lewi, P., e Smeyers-Verbeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.

- Mattivi, F., Vrhovsek, U., Masuero, D., e Trainotti, D. (2009). Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 15, 27-35.
- McMurrough, I., e McDowell, J. (1978). Chromatographic separation and automated analysis of flavanols. *Anal Biochem.* , 91, 92-100.
- Meirelles, C., Sarni, F., Ricardo-da-Silva, J. M., e Moutounet, M. (1992). Evaluation des procyanidines galloylées dans les vins rouges issue de différents modes de vinification. *Proceedings, International Polyphenolic Group Convention.* 16, pp. 175-178. Lisboa: Tome II.
- Mercurio, M. D., e Smith, P. A. (2008). Tannin Quantification in Red Grapes and Wine Comparison of Polysaccharide- and Protein-Based Tannin Precipitation Techniques and Their Ability to Model Wine Astringency. *J. Agric. Food Chem.* , 56, 5528–5537.
- Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., e Ricardo da Silva, J. M. (2003). Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* , 51, 6475-6481.
- Montedoro, G., e Fantozzi, P. (1974). Dosage des tannins dans les moûts et les vins à l'aide de la methyl cellulose et evolution d'autres fractions phenoliques. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie* , 7, 155–161.
- Moreira, J. L., e Santos, L. (2005). Analysis of organic acids in wines by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Anal Bioanal Chem* , 382, 421-425.
- Moreira, J. L., e Santos, L. (2004). Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis. *Anal Chim Acta* , 513, 263–268.
- Moreira, J. L., Marcos, A. M., e Barros, P. (2002). Analysis of Portuguese Wine by Fourier Transform Infrared Spectrometry. *Ciência Téc. Vitiv.* , 17, 27-33.
- Naes, T., Isaksson, T., Fearn, T., e Davies, T. (2002). *A User-friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. Chichester: NIR Publications.
- Ó-Marques, J. D., Reguinga, R., Laureano, O., e Ricardo-da-Silva, J. M. (2005). Changes in grape seed, skins and pulp condensed tannins during berry ripening: effect of fruit pruning. *Ciência Técnica Vitivinícola* , 20, 35-52.

Ó-Marques, J. D., Reguinga, R., Laureano, O., & Ricardo-da-Silva, J. M. (2005). Changes in grape seed, skins and pulp condensed tannins during berry ripening: effect of fruit pruning. *Ciência Técnica Vitivinícola* , 20, 35-52.

Osborne, B. G. (2000). *Near-infrared Spectroscopy in Food Analysis. Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd.

Paschoal, L. R., Ferreira, W. A., Prado, M., e Vilela, A. (2003). Aplicação do método da espectrofotometria de derivadas na identificação e doseamento simultâneo de sistemas multicomponentes. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* , 39, 105-113.

Passos, C. P., Cardoso, S. M., Barros, A. S., Silva, C. M., e Coimbra, M. A. (2010). Application of Fourier transform infrared spectroscopy and orthogonal projections to latent structures/partial least squares regression for estimation of procyanidins average degree of polymerisation. *Analytica Chimica Acta* , 661, 143–149.

Patz, C. D., Blieke, A., Ristow, R., e Dietrich, H. (2004). Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Anal. Chim. Acta* , 513, 81-89.

Peng, Z., Hayasaka, Y., Iland, P., Sefton, M., Hoj, P., e Waters, E. (2001). Quantitative Analysis of Polymeric Procyanidins (Tannins) from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* , 49, 26-31.

Peralta-Zamora, P. G., Cornejo-Ponce, L., Nagata, N., e Poppi, R. J. (1997). Alternativas Quimiometricas para a Resolucao de Problemas Analiticos Clasicos. Determinacao Espectrofotometrica de Zirconio e Hafnio. *Quimica Nova* , 20, 469-474.

Pizarro, C., González-Sáiz, J. M., Esteban-Díez, I., e Orio, P. (2011). Prediction of total and volatile acidity in red wines by Fourier-transform mid-infrared spectroscopy and iterative predictor weighting. *Anal Bioanal Chem* , 399, 2061–2072.

Porter, L. J., Hrstich, L. N., e Chan, B. G. (1986). The conversion of proanthocyanidins and prodelphenidins to cyanidins and delphenidins. *Phytochemistry* , 25, 223-230.

Remy, S., Fulcrand, H., Labarbe, B., Cheynier, V., e Moutounet, M. (2000). First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin–tannin reactions. *J. Sci. Food Agric.* , 80, 745-751.

Renard, C., Baron, A., Guyot, S., e Drilleau, J. (2001). Interactions between apple cell walls and native apple polyphenols: Quantification and some consequences. *International Journal of Biological Macromolecules* , 29, 115–125.

Ricardo da Silva, J. M. (1997). Anthocyanins and proanthocyanidins in grapes and wines. Their primordial role in enology. *Proceedings 1st Symposium 'In Vino Analytica Scientia'*, (pp. 101-113). Bordeaux.

Ricardo-da-Silva, J. M. (1995). Estrutura e composição das procianidinas da uva e do vinho. Efeitos potenciais na saúde. *3º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, 2, pp. 343-355. Évora.

Ricardo-da-Silva, J. M., e Laureano, O. (2004). Estabilidade da matéria corante dos vinhos de regiões de clima quente. *I Workshop Internacional de Pesquisa: A produção de vinhos em regiões tropicais*, (pp. 143-157). Recife, Petrolina.

Ricardo-da-Silva, J. M., Rigaud, J., Cheynier, V., Cheminat, A., e Moutounet, M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry* , 30, 1259-1264.

Rigaud, J., Escribano-Bailon, M. T., Prieur, C., Souquet, J. M., e Cheynier, V. (1993). Normal-phase high-performance liquid chromatographic separation of procyanidins from cacao beans and grape seeds. *J. Chromatogr.* , 654, 255-260.

Rocha, F., e Teixeira, L. (2004). Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria. *Quím. Nova* , 27, 807-812.

Sarneckis, C. J., Dambergs, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J., e Smith, P. A. (2006). Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 12, 39–49.

Sarneckis, C. J., Dambergs, R. G., Mercurio, M. J., Herderich, M. J., e Smith, P. A. (2006). Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research* , 12, 39–49.

Saucier, C., Mirabel, M., Daviaud, F., Longieras, A., e Glories, Y. (2001). Rapid fractionation of grape seed proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* , 49, 5732-5735.

Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* , 30, 3875–3883.

Scalbert, A. (1992). Quantitative methods for the estimation of tannins in plant tissues. In R. W. Hemingway, e P. S. Laks, *Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance* (pp. 259-280). New York: Plenum Press.

Schneider, R., Charrier, F., Moutounet, M., e Baumes, R. (2004). Rapid analysis of grape aroma glycoconjugates using Fourier-transform infrared spectrometry and chemometric techniques. *Anal. Chim. Acta* , 513, 91-96.

Seddon, T., e Downey, M. (2008). Comparison of analytical methods for the determination of condensed tannins in grape skin. *Aust. J. Grape. Wine Res.* , 14, 54–61.

Serrano, J., Puupponen-Pimia, R., Dauer, A., Aura, A., e Saura-Calixto, F. (2009). Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects. *Mol. Nutr. Food Res.* , 53, 310 –329.

Silva, J. M. (1995). Estrutura e composição das procianidinas da uva e do vinho. Efeitos potenciais na saúde. *Actas do 3º Simpósio de Vitivinicultura do Alentejo*, 2, pp. 343-352. Évora.

Singleton, V., Orthofer, R., e Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* , 299, 152-178.

Skoog, D. A., Holler, ,. F., e Nieman, T. A. (2002). Princípios de Análise Instrumental Trad. de Inez Caracelli, Paulo Celso Isolani, Regina Helena de Almeida Santos e Regina Helena Porto Francisco. Porto Alegre. RS.: Ed. Guanabara Dois S.A.

Somers, T. (1971). The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* , 10, 2175-2186.

Somers, T., e Pocock, K. (1991). Phenolic assessment of white musts: Varietal differences in free-run juices and pressings. *Vitis* , 30, 189-201.

Soriano, A., Pérez-Juan, P., Vicario, A., González, J., e Pérez-Coello, M. (2007). Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* (104), 1295–1303.

Souquet, J., Cheynier, V., Brossaud, F., e Moutonnet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* , 43, 509-512.

- Spranger, M., Sun, B., Leandro, M. C., e Bechior, A. P. (1998). Changes in anthocyanins, catechins and proanthocyanidins during fermentation and early post-fermentation of red grapes. *Proceeding of XXIII Word Congress on Vine and Wine*, (pp. 183-189). Lisboa.
- Stevanato, R., Fabris, S., e Momo, F. (2004). Enzymatic method for the determination of total phenolic content in tea and wine. *J. Agric. Food Chem.* , 52, 6287–6293.
- Su, C. T., e Singleton, V. (1969). Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry* , 8, 1553-1558.
- Sun, B., e Spranger, I. (2005). Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. *Ciência Téc. Vitiv.* , 59-89.
- Sun, B., Belchior, G. P., Ricardo-da-Silva, J. M., e Spranger, M. I. (1999). Isolation and purification of dimeric and trimeric procyanidins from. *Journal of Chromatography* , 841, 115–121.
- Sun, B., Leandro, C., Ricardo-da-Silva, J. M., e Spranger, I. (1998b). Separation of Grape and Wine Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization. *J. Agric. Food Chem.* , 46, 1390-1396.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J. M., e Spranger, I. (1998a). Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* , 46, 4267-4274.
- Swanepoel, M., du Toit, M., e Nieuwoudt, H. H. (2007). Optimisation of the quantification of total soluble solids, pH and titratable acidity in South African grape must using FourierTransform Mid-infrared spectroscopy. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* , 28 (2), 140-149.
- Timberlake, C., e Bridle, P. (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* , 27, 97-105.
- Urtubia, A., Pérez-Correa, J. R., Meurens, M., e Agosin, E. (2004). Monitoring large scale wine fermentations with infrared spectroscopy. *Talanta* , 64, 778-784.
- Urtubia, A., Pérez-Correa, J. R., Pizarro, F., e Agosin, E. (2008). Exploring the applicability of MIR spectroscopy to detect early indications of wine fermentation problems. *Food Control* , 19, 382-388.
- Versari, A., Boulton, R., e Thorngate, J. (2004). The prediction of the color components of red wines using FTIR, wine analyses, and the method of partial least squares. *ACS Symposium Series* , 886, 53–67.

Versari, A., Laghi, L., Thorngate, J. H., e Boulton, R. B. (2011). Prediction of colloidal stability in white wines using infrared spectroscopy. *Journal of Food Engineering* , 104, 239–245.

Versari, A., Parpinello, G. P., Scazzina, F., e Del Rio, D. (2010). Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Control* , 21, 786–789.

Vidal, S., Cartalade, D., Souquet, J., Fulcrand, H., e Cheynier, V. (2002). Changes in Proanthocyanidin Chain Length in Winelike Model Solutions. *J. Agric. Food Chem.* , 50, 2261-2266.

Wiberg, K. (2004). *Multivariate spectroscopic methods for the analysis of solutions*. Stockholm University: PhD Thesis.

Wynne, L., Clark, S., Adams, M., e Barnett, N. (2007). Compositional dynamics of a commercial wine fermentation using two-dimensional FTIR correlation analysis. *Vibrational spectroscopy* , 44, 394-400.

7. Anexos

Quadro 1 – Teores de taninos condensados poliméricos (FIII), oligoméricos (FII) e 3-flavanóis monoméricos (FI) expressos em mg/L de epicatequina e teores de taninos condensados totais expressos em mg/L de catequina.

Nº	Amostra	FIII	FII	FI	Taninos condensados totais
1	Trincadeira - 2001	99	9	15	1086
2	Trincadeira - 2001	98	12	14	1093
3	Castelão - 1999	107	13	14	262
4	Castelão - 1999	104	12	13	237
5	Castelão - 1971	129	8	5	1504
6	Castelão - 1971	150	6	5	1683
7	Castelão - 1969	169	5	4	1356
8	Castelão - 1969	138	4	4	1241
9	Cabernet S. - 2000	131	21	5	946
10	Cabernet S. - 2000	153	15	4	834
11	Trincadeira - 2000	142	10	10	672
12	Trincadeira - 2000	151	11	9	644
13	Castelão - 1976	155	13	5	1595
14	Castelão - 1976	150	15	7	1542
15	Syrah - 2000	149	7	16	925
16	Syrah - 2000	153	6	19	971
17	Touriga N. - 2005	158	18	16	1132
18	Touriga N. - 2005	159	14	17	1069
19	Touriga N. - 2001	148	27	19	1476
20	Touriga N. - 2001	152	25	15	1378
21	Syrah - 2002	184	28	12	879
22	Syrah - 2002	185	26	11	935
23	Trincadeira - 1999	216	10	3	465
24	Trincadeira - 1999	212	9	6	420
25	Syrah - 1999	192	23	7	1549
26	Syrah - 1999	232	17	6	1599
27	Cabernet S. - 1999	227	6	5	1399
28	Cabernet S. - 1999	234	11	8	1469
29	Syrah - 2006	273	12	11	1630
30	Syrah - 2006	257	9	13	1662
31	Touriga N. - 2004	284	20	3	1111
32	Touriga N. - 2004	309	23	4	1062
33	Touriga N. - 2008	291	32	12	1486
34	Touriga N. - 2008	320	25	14	1521
35	Trincadeira - 2010	270	37	13	623
36	Trincadeira - 2010	203	42	13	627
37	Castelão - 2005	376	27	14	1027
38	Castelão - 2005	338	21	12	1104

Quadro 1 – Teores de taninos condensados poliméricos (FIII), oligoméricos (FII) e 3-flavanóis monoméricos (FI) expressos em mg/L de epicatequina e teores de taninos condensados totais expressos em mg/L de catequina (continuação).

Nº	Amostra	FIII	FII	FI	Taninos condensados totais
39	Castas variadas - 2002	329	51	14	865
40	Castas variadas - 2002	358	51	14	911
41	Touriga N. - 2008	428	64	17	1574
42	Touriga N. - 2008	340	32	17	1732
43	Trincadeira - 2005	354	30	16	1300
44	Trincadeira - 2005	376	30	15	1318
45	Syrah - 2010	394	44	4	1125
46	Syrah - 2010	428	41	5	1023
47	Trincadeira - 2009	505	31	7	658
48	Trincadeira - 2009	389	27	10	700
49	Castelão ISA - 2009	428	33	18	865
50	Castelão ISA - 2009	441	32	17	956
51	Castas variadas - 2011	464	49	12	1781
52	Castas variadas - 2011	426	40	13	2020
53	Syrah - 2008	455	49	18	1107
54	Syrah - 2008	450	40	10	978
55	Syrah - 2009	671	35	9	1248
56	Syrah - 2009	563	21	9	1104
57	Castelão - 2009	568	39	12	1023
58	Castelão - 2009	583	36	12	1065
59	Castelão - 2010	1144	130	18	1251
60	Castelão - 2010	1149	162	11	1356
61	Cabernet S. - 2006	543	47	19	1728
62	Cabernet S. - 2006	565	56	21	1788
63	Cabernet S. - 2009	543	47	19	1900
64	Cabernet S. - 2009	565	56	21	1735
65	Touriga N. - 2010	613	78	15	1371
66	Touriga N. - 2010	579	66	14	1423
67	Castas variadas - 2011	595	89	16	1388
68	Castas variadas - 2011	588	84	17	1335
69	Aragonês - 1999	773	56	3	2192
70	Aragonês - 1999	707	54	7	2195
71	Castas variadas - 2010	775	96	24	1311
72	Castas variadas - 2010	608	143	18	1199
73	Castas variadas - 2008	806	55	10	1539
74	Castas variadas - 2008	788	44	13	1486
75	Cabernet S. / Syrah - 2007	761	149	28	1567
76	Cabernet S. / Syrah - 2007	750	154	27	1385
77	Cabernet S. / Syrah - 2006	849	116	30	1269
78	Cabernet S. / Syrah - 2006	791	129	28	1332
79	Cabernet S. / Syrah - 2008	833	118	21	1971
80	Cabernet S. / Syrah - 2008	1131	85	16	2069

Quadro 3 – Teores de taninos condensados poliméricos (FIII), oligoméricos (FII) e 3-flavanóis monoméricos (FI) expressos em mg/L de epicatequina e teores de taninos condensados totais expressos em mg/L de catequina (continuação).

Nº	Amostra	FIII	FII	FI	Taninos condensados totais
81	Aragonês - 2007	980	83	10	1392
82	Aragonês - 2007	901	64	10	1448
83	Syrah - 2005	946	46	24	2371
84	Syrah - 2005	964	41	22	2466
85	Alicante B. / Aragonês - 2011	935	85	6	1549
86	Alicante B. / Aragonês - 2011	930	111	8	1553
87	Touriga N. - 2008	986	139	17	2149
88	Touriga N. - 2008	901	126	29	2118
89	Castas variadas - 2009	930	130	19	1893
90	Castas variadas - 2009	883	127	19	2016
91	Touriga N. - 2008	1099	110	33	1813
92	Touriga N. - 2008	937	82	15	1827
93	Syrah/ Touriga N. / Cabernet S. - 2010	1079	68	18	1939
94	Syrah/Touriga N. / Cabernet S. - 2010	1034	69	22	1869
95	Castelão - 2010	1144	130	18	1251
96	Castelão - 2010	1149	162	11	1356
97	Castas variadas - 10	1194	217	23	2244
98	Castas variadas - 10	1135	236	21	2244
99	JP - 2011	1245	214	16	2146
100	JP - 2011	1250	214	16	2041
101	Castas variadas - 2010	1369	176	12	2072
102	Castas variadas - 2010	1369	176	12	2111
103	Touriga / Syrah ISA - 2011	1383	134	29	2244
104	Touriga / Syrah ISA - 2011	1453	121	30	2325
105	Castas variadas - 2010	1423	210	18	3111
106	Castas variadas - 2010	1401	223	23	2813
107	Castas variadas - 2010	2009	147	13	2181
108	Castas variadas -2010	2009	147	13	2262
109	Castas variadas - 2011	2176	444	43	3093
110	Castas variadas - 2011	2153	487	48	3216